

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS MODELOS DE INDUÇÃO QUÍMICA
DE DIABETES *Mellitus* TIPO 1 EM RATOS *Wistar***

JOÃO PESSOA – PB

2017

RAFAEL CARLOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS MODELOS DE INDUÇÃO QUÍMICA
DE DIABETES *Mellitus* TIPO 1 EM RATOS *Wistar***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação de Farmácia do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice

Orientadora

Prof. Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho

Coorientador

JOÃO PESSOA – PB

2017

F383a Ferreira, Rafael Carlos.

Avaliação comparativa entre dois modelos de indução química de diabetes mellitus tipo 1 em ratos Wistar / Rafael Carlos Ferreira. - - João Pessoa, 2017.
68f.: il. -

Orientadora: Temilce Simões de Assis Cantalice.

Coorientador: Ivan Rodrigues de Carvalho Filho.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Aloxana. 2. Estreptozotocina. 3. Diabetes mellitus.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.252.349.7(043.2)

RAFAEL CARLOS FERREIRA


**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE DOIS MODELOS DE INDUÇÃO QUÍMICA
DE DIABETES *Mellitus* TIPO 1 EM RATOS *Wistar***

APROVADO EM 27/03/2017

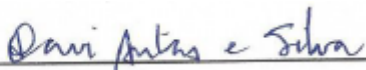
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice
Orientadora – DFP/CCS/UFPB



Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
Avaliador interno – DCF/CCS/UFPB



Prof. Dr. Davi Antas e Silva
Avaliador externo – DFP/CCS/UFPB

JOÃO PESSOA – PB

2017

Aos meus pais, Rosa e Geraldo, e em especial à minha eterna mestre e mãe, Francisca Mendes (in memoriam), minha avó e inspiração, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por ter permitido que tantos obstáculos fossem superados até aqui.

À minha **família**, meu alicerce, onde sem ela não haveriam conquistas, em especial à Maria do Socorro e Gorete por todo o apoio prestado desde a minha aprovação no vestibular em 2012 até o dia de hoje. Muito obrigado por serem tão presentes e por terem assumido um papel que não lhes pertencia.

À minha orientadora, amiga, conselheira, mestre, **profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice** pela confiança, por acreditar que eu seria capaz de realizar esse trabalho, por todo o auxílio prestado e por literalmente ir à bancada e colocar as “mãos na massa”. Saiba que todas as palavras proferidas pela senhora, as de orientação acadêmica e da vida, estão guardadas em meu coração. A você, todo o meu respeito e mais profunda admiração!

A **Jéferson, Lisandra, Mel, Romário, Luiz Henrique, Carol, Nayara, Nathalie, Thallys, Paulo Ricardo, Ramon, Silvana, Wênia, Ana Maria, Lucivânia, Fatinha, Augusto, Igor Pacheco, Jade, Jean, Maressa, João Paulo, André, Jephesson, Monalisa Brito e Marreiro** agradeço por todo o apoio, ajuda e motivação na vida e na realização desse trabalho, em especial a Anderson Barbosa, que foi meu braço direito na realização dessa pesquisa. Além de um colega de pesquisa, ganhei um grande amigo! Obrigado, de coração!

O que falar de **Flavia e Fagner**? Dois irmãos que a vida me deu e que sempre estiveram comigo, me ajudando e acreditando no meu potencial. Saibam que nosso laço de amizade é eterno e que essa jornada teria sido muito mais difícil sem vocês.

A **Rayane Nascimento** que junto a Flavia e eu, enfrentou todos os problemas do processo de abreviação de curso, vindo a ser uma amiga que quero para o resto da vida! Olha só, vencemos juntos!

Aos amigos do laboratório de oncofarmacologia (ONCOFAR), **Tati Mota, Taty Kelvia, Ana Luiza, Ana Luisa, Ana Paula, Viviane, Renata, Ryldene, Fernando, Thaís, Daiene** e em especial à professora. **Dra. Marianna Vieira Sobral** por todo o carinho e apoio na minha vida acadêmica.

Aos **colegas do curso de Farmácia da UFPB**, por terem compartilhado tantas experiências boas e terem oferecido tanto apoio nesses últimos 5 anos da minha vida. Sentirei saudades.

À **equipe técnica do biotério prof. Thomas George**, obrigado por toda a ajuda prestada, em especial à Lourdes por todo carinho em ajudar e à veterinária Roberta.

Aos professores do curso de Farmácia da UFPB, em especial aos grandes mestres **prof. Fábio, prof. Hemerson, prof. Adalberto e prof. Robson** por serem grandes amigos nessa caminhada, dando-me bons conselhos e o incentivo necessário para seguir em frente.

À **professora Dra. Bagnólia**, toda a minha gratidão em ter contribuído de maneira tão significativa na minha formação acadêmica. Agradeço ainda, por toda a força dada no processo de abreviação de curso. Muito obrigado!

À **Evandro e Vina**, funcionários da UFPB que se tornaram bons amigos, muito obrigado por todo o apoio e incentivo.

A **Universidade Federal da Paraíba** por ter proporcionado uma formação de qualidade.

A todos que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, o meu muito obrigado!

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade”*

Albert Einstein

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um importante problema de saúde pública não apenas devido a sua incidência, mas também ao seu potencial de morbimortalidade. Os modelos animais têm exercido papel importante na busca pelo entendimento da história natural da doença e por alternativas terapêuticas que contribuam para a redução das consequências associadas a essa doença. A indução química do DM tem sido amplamente utilizada, sendo a aloxana e a estreptozotocina (STZ) as drogas mais importantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia entre essas drogas atentando para a relação indução/mortalidade e para as alterações clínicas e histopatológicas. A injeção intraperitoneal de aloxana induziu 50% dos animais à doença e 20% ao óbito. O tratamento com STZ levou 90% dos animais a ficarem diabéticos e a apenas 10% de insucesso, não sendo observada nenhuma morte após a sua injeção intraperitoneal. O grupo TALX apresentou consumos médios de água e ração de $209,6 \pm 5,7$ mL e $43,5 \pm 3,7$ g respectivamente. Já para o grupo TSTZ foram observados consumos médios de água e ração de $220,4 \pm 5,7$ mL e $48,3 \pm 1,2$ g. O volume de urina excretado para os grupos TALX e TSTZ foi de $144,4 \pm 5,9$ mL e $156,7 \pm 5,5$ mL, respectivamente. A perda média de peso, entre a primeira e última semana de experimento foi de $63,8 \pm 44,5$ g para o grupo TALX e $59,9 \pm 36,1$ g para o grupo TSTZ. Na avaliação semanal da glicemia foi possível observar aumento significativo, sendo a média de $434,4 \pm 133,6$ mg/dL na primeira semana e $491,8 \pm 117,9$ mg/dL na quarta semana para o grupo TALX e de $402,2 \pm 32,7$ mg/dL e $459,8 \pm 199,1$ mg/dL para o grupo TSTZ. A análise histopatológica de fígado, rins e pâncreas, permitiu a observação de alterações nesses órgãos em todos os animais diabéticos. Não foram observadas alterações histopatológicas e em nenhum dos parâmetros clínicos do grupo controle. Esses resultados sugerem que a indução química do DM é mais satisfatória usando STZ quando comparado ao uso de aloxana em ratos *Wistar* quando mantidos em gaiolas metabólicas. Ainda, pode-se concluir que a polidipsia, polifagia e poliúria foi mais acentuada nos animais induzidos por STZ, não havendo diferenças significativas de perda de peso e glicemia de jejum entre os grupos TALX e TSTZ.

Palavras-chave: Aloxana. Estreptozotocina. Diabetes *mellitus*.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is an important public health problem not only due to its incidence, but also to its potential for morbidity and mortality. Animal models play an important role in understanding a natural history of the disease and other therapeutic alternatives that contribute to a reduction in the consequences associated with this disease. Chemical induction of DM has been widely used, with alloxan and streptozotocin (STZ) being the most important drugs. The objective of this study was to evaluate the efficacy between these drugs considering the relation between induction/mortality and clinical and histopathological changes. Intraperitoneal injection of alloxan induced 50% of the animals in the disease and 20% at death. Treatment with STZ took 90% of the animals to become diabetic and only 10% of failure, and no intraperitoneal injection was observed. The TALX group had mean water and feed intake of 209.6 ± 5.7 mL and 43.5 ± 3.7 g, respectively. For the TSTZ group, mean water and feed intake of 220.4 ± 5.7 mL and 48.3 ± 1.2 g were observed. The volume of urine excreted for the TALX and TSTZ groups was 144.4 ± 5.9 mL and 156.7 ± 5.5 mL, respectively. The mean weight loss between the first and last week of the experiment was 63.8 ± 44.5 g for the TALX group and 59.9 ± 36.1 g for the TSTZ group. In the weekly assessment of blood glucose for an increase of 434.4 ± 133.6 mg/dL in the first week and 491.8 ± 117.9 mg/dl in the fourth week for the TALX group and 402.2 ± 32.7 mg/dL and 459.8 ± 199.1 mg/dL for the TSTZ group. The histopathological analysis of the liver, kidneys and pancreas allowed an observation of organ changes in all diabetic animals. No histopathological changes were observed and in none of the clinical parameters of the control group. These results suggest that the chemical induction of DM is more satisfactory using STZ when compared to the use of alloxan in rats when kept in metabolic cages. Furthermore, it can be concluded that polyuria, polyphagia and polyuria were more pronounced in STZ-induced animals, and there were no significant differences in weight loss and fasting glycemia between the TALX and TSTZ groups.

Key words: Alloxan. Streptozotocin. Diabetes *mellitus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de liberação da insulina	20
Figura 2 – Mecanismos de sinalização da insulina	21
Figura 3 – Estrutura molecular da aloxana	25
Figura 4 – Mecanismos de ação diabetogênicos da aloxana	26
Figura 5 – Reações de ciclisto redox entre a aloxana e o ácido dialúrico	28
Figura 6 – Estrutura molecular da estreptozotocina	29
Figura 7 – Mecanismos de ação da estreptozotocina	30
Figura 8 – Condição física de animais do grupo controle, TALX e TSTZ	42
Figura 9 – Alteração peniana presente em animais diabéticos induzidos com injeção única de aloxana e estreptozotocina	43
Figura 10 – Análise histológica dos pâncreas dos animais diabéticos e saudáveis	44
Figura 11 – Análise histológica dos rins dos animais diabéticos e saudáveis	45
Figura 12 – Análise histológica dos fígados dos animais diabéticos e saudáveis	46

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Efeito da aloxana e estreptozotocina sobre o volume de água ingerida pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle 38
- Gráfico 2 – Efeito da aloxana e estreptozotocina sobre a quantidade de ração ingerida pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle 39
- Gráfico 3 – Efeito da aloxana e estreptozotocina sobre o volume de urina excretado pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle 39
- Gráfico 4 – Efeito do tratamento de ratos com aloxana e estreptozotocina sobre o peso corporal em gramas 40
- Gráfico 5 – Valores glicêmicos de animais controle e diabéticos induzidos com aloxana e estreptozotocina 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número e percentuais de animais diabéticos sobreviventes, animais não diabéticos e óbitos de ratos submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana (120 mg/kg) ou estreptozotocina (60 mg/kg)	37
Tabela 2 – Consumo de água, ração e volume de urina de animais diabéticos e saudáveis	38
Tabela 3 – Evolução ponderal de ratos induzidos ao diabetes com aloxana e estreptozotocina	40
Tabela 4 – Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais diabéticos e saudáveis	41
Tabela 5 – Custos, em reais, para indução de DM1 usando aloxana (120 mg/kg) e STZ (60 mg/kg)	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AH•	Radical aloxana
AH₂	Ácido dialúrico
ATP	Adenosina trifosfato
CALX	Controle aloxana
Ca_v	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
CSTZ	Controle estreptozotocina
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM1A	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1A
DM1B	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1B
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas de oxigênio
G-6-P	Glicose-6-fosfato
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
GSH	Tripeptídeo glutationa
H.E	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
MNU	N-Metil-N-Nitrosureia
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂^{•-}	Radicais superóxido
OH•	Radicais hidroxila
PARP	Poli(ADP-ribose)polimerase
PsiFARM	Laboratório de Psicofarmacologia
RNA	Ácido ribonucleico
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida

STZ	Estreptozotocina
TALX	Teste aloxana
TSTZ	Teste estreptozotocina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Diabetes <i>mellitus</i> e insulina	19
2.2	Prevalência	22
2.3	Tipos de diabetes	23
2.4	Modelos animais de indução do diabetes	23
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	MATERIAL	33
4.1.1	Locais da pesquisa	33
4.1.2	Substâncias utilizadas	33
4.1.3	Animais e condições experimentais	33
4.1.4	Aparelhagem	34
4.2	MÉTODOS	34
4.2.1	Indução química do diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	34
4.2.2	Indução com uso de estreptozotocina	34
4.2.3	Indução com uso de aloxana	34
4.2.4	Avaliação clínica dos animais saudáveis e diabéticos	35
4.2.5	Análise histopatológica de rins, fígado e pâncreas dos animais saudáveis e diabéticos	35
4.2.6	Análise estatística	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Indução do diabetes <i>mellitus</i> usando injeção única intraperitoneal de aloxana e estreptozotocina	37
5.2	Consumo de água e ração e volume urinário	37
5.3	Evolução do peso corporal dos animais saudáveis e diabéticos	39
5.4	Avaliação glicêmica dos animais saudáveis e diabéticos	41
5.5	Avaliação clínica dos animais saudáveis e diabéticos	42
5.6	Análise histopatológica de rins, fígado e pâncreas dos animais saudáveis e diabéticos	43

6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizado por hiperglicemia e outras anormalidades metabólicas (YANOFF; SASSANI, 2015), causadas por deficiência absoluta ou relativa de insulina ou ainda por defeitos na sua ação (SPERLING, 2014).

A carga global dessa doença e de distúrbios metabólicos associados atingiu proporções catastróficas e continua a subir a uma taxa alarmante (SARGIS, 2014) fazendo dessa doença um importante problema de saúde pública (PATRÍCIO et al., 2015). Em 2015, foram registrados 415 milhões de casos no mundo, valor que, segundo estimativas da *International Diabetes Federation*, deve aumentar para cerca de 642 milhões no ano de 2040. No Brasil, foram registrados 11 milhões de casos em 2014 e 14,3 milhões em 2015. Estimativas para 2040 apontam que serão 23,2 milhões de brasileiros convivendo com o diabetes (IDF, 2016).

Essa doença acarreta significativos prejuízos à sociedade em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (BRASIL, 2006 apud BRAGA, 2014) que podem ser ampliados em virtude das complicações associadas (FUZINATO et al., 2016).

Revisando trabalhos publicados entre 2007 a 2011, de diversos países inclusive o Brasil, Ng e colaboradores (2014) apontam para os altos custos relacionados ao diabetes. Esse estudo mostra que as estimativas para os custos totais anuais de DM variaram de 141,6 milhões a 174 bilhões de dólares, sendo que os custos diretos variaram de 150 a 14.060 dólares por paciente ao ano, enquanto que os custos indiretos variaram de 39,6 a 7.164 dólares. O custo de internação foi o principal contribuinte para o custo direto na metade dos estudos que incluíram custos de internação, serviços médicos e medicamentos.

Tendo isso em mente, mostra-se necessária a realização de pesquisas que visem a obtenção de novos conhecimentos que possam ser usados para reduzir as consequências associadas ao diabetes. Esses estudos mostram-se importantes para a compreensão dos mecanismos complexos que fundamentam o desenvolvimento do diabetes e suas complicações, o que se mostra necessário para o entendimento da história natural da doença, além de possibilitar a identificação de novos alvos para a terapia e reavaliação das intervenções e tratamentos já existentes (RADENKOVIĆ et al., 2016).

Apesar de todos os avanços experimentais vivenciados atualmente, muitas respostas de questões relacionadas ao que foi mencionado só podem ser obtidas por meio da realização de procedimentos invasivos ou observações restritas em seres humanos, quer por razões logísticas ou éticas (KAPLAN; WAGNER, 2006 apud RADENKOVIĆ et al., 2016). Dessa forma, diversos estudos experimentais no campo do diabetes têm sido realizados utilizando modelos animais (GARGOURI et al., 2016; SAMARGHANDIAN et al., 2016; REDIVO et al., 2016; BHAKKIYALAKSHMI et al., 2016; CHAUHAN et al., 2016; MOHAMMED et al., 2016; MELISSAS et al., 2016; MORALES et al., 2017) Devido à duração de tempo e aos recursos necessários para a maioria das técnicas, o DM induzido quimicamente oferece a opção mais rápida e econômica (DEEDS et al., 2011), sendo a aloxana e estreptozotocina (STZ) os agentes diabetogênicos mais importantes (RADENKOVIĆ et al., 2016).

Sabendo-se da necessidade da elaboração de protocolos de indução experimental usando essas substâncias em ratos *Wistar* com vista a posteriores estudos de atividade farmacológica relacionadas ao diabetes e suas complicações, o presente trabalho se propôs a realizar um estudo comparativo das induções de DM utilizando aloxana e STZ.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes *mellitus* e Insulina

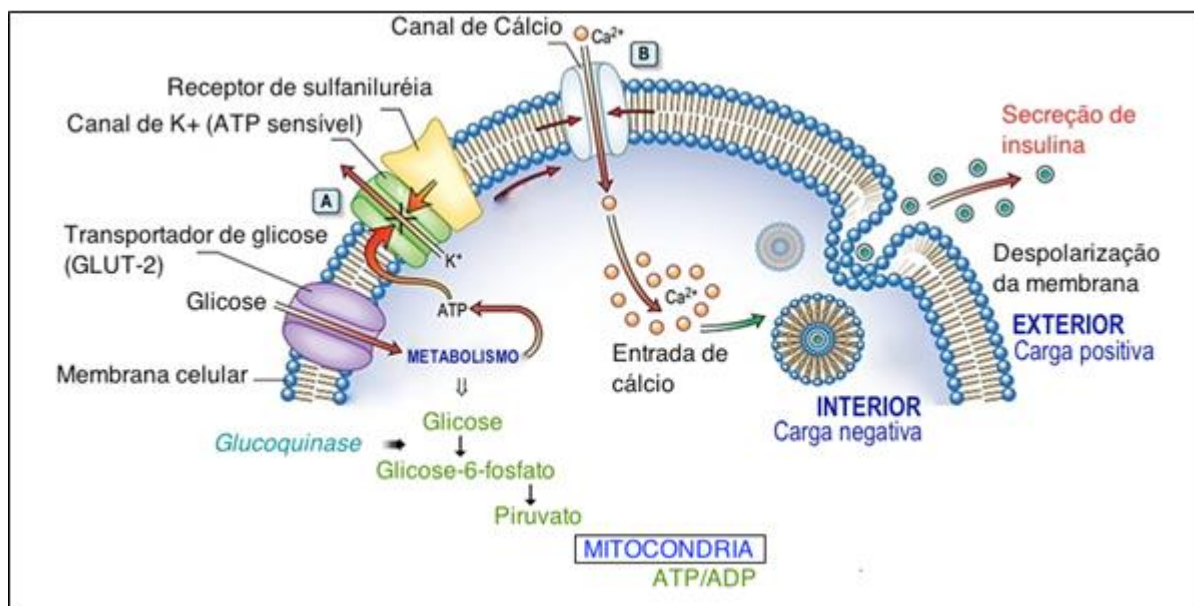
O diabetes *mellitus* (DM) caracteriza-se como um conjunto de desordens metabólicas de etiologia variada, decorrentes de defeitos nos mecanismos de secreção e/ou ação da insulina em seus sítios de ação, levando ao aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) e a prejuízos no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (FERNANDES, 2013; AL-AWAR et al., 2016; RODEN, 2016; SBD, 2016).

A insulina é um hormônio anabólico (MOREIRA et al., 2015) sintetizado e secretado pelas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans, cuja secreção é regulada por fatores ambientais, hormônios como o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), neurotransmissores autonômicos, como a acetilcolina, e pela ação de vários nutrientes, sendo a glicose o principal estímulo para a secreção de insulina, por ser componente alimentar principal e por se acumular imediatamente após a ingestão de alimentos (FU et al., 2014; NEWSHOLME et al., 2014; RUTTER et al., 2015).

A glicose penetra na célula β pancreática por meio de difusão facilitada via transportador de glicose GLUT-2, expresso constitutivamente nessas células, sendo posteriormente fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) preponderantemente pela hexoquinase IV (BRUNTON et al., 2012).

A principal rota da G-6-P é a glicólise que leva ao aumento intracelular da relação ATP:ADP causando uma modulação negativa dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Essa inibição causa a despolarização da membrana plasmática da célula β pancreática, o que leva à modulação positiva de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Ca_v) causando influxo de íons cálcio com consequente exocitose da insulina presente em vesículas que se fundem à membrana plasmática da célula β pancreática (Figura 1) (BRUNTON et al., 2012; FU et al., 2014; RUTTER et al., 2015).

Figura 1 – Mecanismo de liberação da insulina



Fonte: Disponível em <www.medicinageriatrica.com.br/tag/glut-4/> Acesso em março de 2017.

A insulina exerce um importante papel no crescimento e desenvolvimento dos tecidos, bem como, no controle da homeostase da glicose, principalmente no fígado, músculo e gordura estimulando o uso e armazenamento celular da glicose, de aminoácidos e ácidos graxos e inibindo processos catabólicos (Figura 2) (SAMUEL; SHULMAN, 2012; BRAZ, 2015).

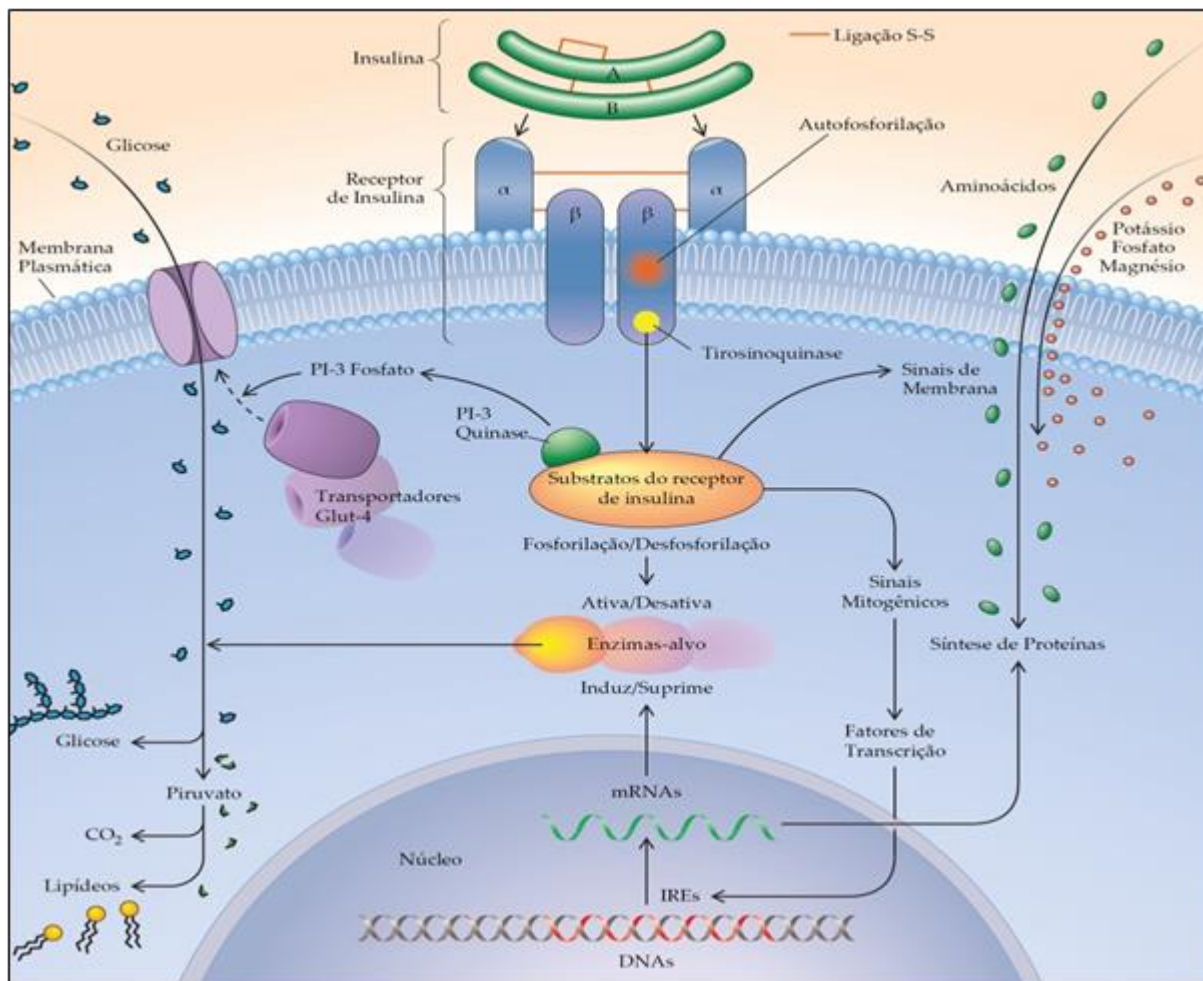
A secreção inadequada de insulina pode ocorrer pela sua produção insuficiente ou em decorrência da falência das células β pancreáticas em reconhecer os estímulos para sua secreção. Já a ação minimizada da insulina nos tecidos periféricos pode ser ocasionada, por exemplo, pela redução de seus receptores na superfície das células-alvo (PEREIRA, 2008).

A falta de insulina leva à diminuição da síntese de glicogênio e à absorção reduzida da glicose pelas células, gerando aumento da glicogenólise e diminuição da captação de glicose pelo fígado para armazenamento e reserva energética (PEREIRA, 2008). A hiperglicemia resultante se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, polifagia, visão turva, perda de peso, susceptibilidade a certas infecções, cetoacidose diabética e síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica com risco de coma (RODEN, 2016).

As alterações no metabolismo proteico em função da baixa biodisponibilidade de insulina se baseiam na redução da taxa de síntese proteica (BERTOLINI, 2013) podendo levar a redução da massa muscular, retardo na estatura (ADAMS, 1998;

LUCIANO et al., 1998) e a dificuldades no reparo de tecidos após lesões ou infecções (CHARLTON; NAIR, 1998). A hipoinsulinemia causa ainda o aumento da degradação e oxidação de lipídios, resultando em excessiva produção de cetonas (KELLY et al., 2003 apud ARANTES, 2013).

Figura 2 – Mecanismos de sinalização da insulina



Legenda: A via de sinalização da insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas se inicia quando esse hormônio interage com seu receptor de membrana plasmática. Esse receptor é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como o Substrato do Receptor de Insulina (IRS). Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídios e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (CARVALHEIRA et al, 2002 apud PEREIRA, 2014).

Fonte da imagem: Genuth (2008).

2.2 Prevalência

A prevalência do DM está aumentando a um ritmo alarmante e a mortalidade está obviamente aumentando em paralelo (ALBERTI; ZIMMET, 2013). Segundo a *International Diabetes Federation*, o número de diabéticos em 2015 era de 415 milhões em todo o mundo, o que, em outras linhas, representa 1 doente a cada 11 adultos. Estimativas indicam que no ano de 2040 esse número aumente consideravelmente para cerca de 642 milhões de casos (IDF, 2016).

Na América Latina, a estimativa para 2040 é que o número de diabéticos aumente em 65%. Em 2015, a doença foi responsável por 01 morte a cada 06 segundos, superior às mortes causadas pela malária, tuberculose e HIV/SIDA quando somadas, sendo responsável pelo gasto de 34,6 bilhões de dólares com estimativas de 55,6 bilhões de dólares para 2040 em gastos em saúde. No Brasil, em 2015, cerca de 14,3 milhões de brasileiros conviviam com o diabetes, sendo que metade dos casos ainda não tinha sido diagnosticada. Estimativas para o ano de 2040 é que o nosso país tenha cerca de 23,2 milhões de pessoas convivendo com a doença (IDF, 2016).

Esse grande número de doentes se projeta em custos incontrolláveis e insustentáveis tanto para o indivíduo como para a sociedade (SARGIS, 2014) fazendo com que esses gastos girem em torno de bilhões de dólares os sistemas de saúde no mundo (ALMEIDA et al., 2014). É sabido que 12% dos gastos em saúde no mundo, em 2015, foram relacionados ao diabetes, correspondendo a 673 bilhões de dólares americanos. Para 2040, as estimativas apontam para um gasto superior a 802 bilhões de dólares (IDF, 2015).

Alguns fatores podem justificar o aumento do número de casos de DM: modificação nos hábitos alimentares, crescimento populacional global, envelhecimento, urbanização e obesidade, inatividade física e maior sobrevivência de pacientes com essa doença (GUARIGUATA et al., 2014; BORTOLUZ et al., 2016; SBD, 2016).

2.4 Tipos de diabetes

Atualmente, o DM é classificado conforme a etiologia (SBD, 2016). A *American Diabetes Association* (ADA, 2017) classifica o DM em quatro classes clínicas: 1) diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1, onde há destruição autoimune das células β pancreáticas, levando à deficiência de insulina); 2) diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2, onde é observada perda progressiva da secreção de insulina das células β , com antecedente resistência à insulina); 3) diabetes *mellitus* gestacional (DMG, diabetes diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, não evidente antes da gestação); e 4) outros tipos específicos, que ocorrem devido a outras causas como, por exemplo, doenças do pâncreas exócrino e MODY.

O DM tipo 1 (DM1), abordado nesse estudo, anteriormente conhecido como diabetes insulino-dependente ou diabetes juvenil, é resultante da destruição autoimune das células β pancreáticas que leva a uma deficiência de insulina (CANIVELL; GOMIS, 2014; SBD, 2016) sendo a aplicação subcutânea de insulina a base do tratamento dos pacientes com esse tipo de diabetes (ALMEIDA et al., 2014).

Marcadores dessa destruição imunológica (anticorpos anti-insulina, antitirosina-fosfatases, entre outros) podem ser encontrados em até 90% dos indivíduos. Essa forma de diabetes é classificada como DM tipo 1A (DM1A) ou autoimune e corresponde de 5 a 10% dos casos de DM (SBD, 2016). No entanto, uma minoria dos casos de DM1 não tem etiologia conhecida. Alguns desses doentes apresentam uma insulinopenia permanente e tendência à cetoacidose, mas não tem nenhuma evidência de autoimunidade. Esse tipo de diabetes é classificado com DM tipo 1B (DM1B) ou idiopático (ADA, 2017).

Devido à avaliação dos autoanticorpos não se encontrar disponível em todos os centros, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível (SBD, 2016).

2.5. Modelos animais de indução de diabetes

Os modelos animais têm sido extensivamente usados para obter diferentes informações sobre várias condições patológicas. Atualmente, muitos modelos animais de diabetes foram criados (RADENKOVIĆ et al., 2016) mostrando-se indispensáveis para a pesquisa em diabetes e suas complicações (WU; YAN, 2015)

bem como para o desenvolvimento e rastreio de novos fármacos antidiabéticos (TRIPATHI; VERMA, 2014).

A indução experimental dessa doença em animais de laboratório pode ser feita usando manipulação química, genética e cirúrgica/imunológica (RADENKOVIĆ et al., 2016) com uso de técnicas que incluem: destruição química das células β pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células β ou pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição *in utero* ou altas doses de hormônios contra regulatórios como os glicocorticóides (TRIPATHI; VERMA, 2014; CAZAROLLI, 2004 apud SILVA et al., 2015; SHARMA et al., 2016; AL-AWAR et al., 2016). Porém, alguns modelos apresentam algumas desvantagens que inviabilizam o seu uso, como é o caso da utilização de modelos virais relacionados aos vírus RNA, altamente espécie-específicos, que se constituem em risco potencial para o experimentador, tendo ainda papel incerto na indução da doença (LERCO et al., 2003).

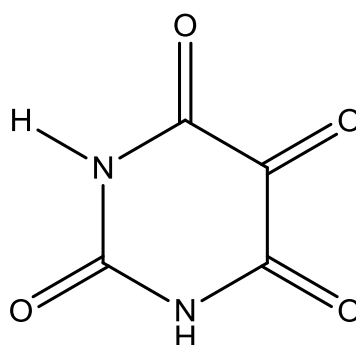
Os métodos químicos, por sua vez, são muito simples, convenientes (SZKUDELSKI, 2001) e viáveis para este tipo de experimentação, pois exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (LERCO et al., 2003). A aloxana e a STZ são os agentes mais amplamente usados nos trabalhos de investigação do diabetes, podendo induzir ao diabetes tipo 1 ou tipo 2, sendo mais comumente utilizado para a indução do diabetes de tipo 1, porque eles são incapazes de induzir diretamente uma resistência à insulina (ETUK, 2010; RADENKOVIĆ et al., 2016; ISLAM et al., 2017).

A aloxana (5,6-dioxiuracil; 2,4,5,6-tetraoxipirimidina) é um ácido fraco, bastante hidrofílico (ISLAM et al., 2017), derivado sintético da pirimidina e análogo citotóxico da glicose, sintetizada por oxidação do ácido úrico (Figura 3) (LENZEN, 2008) de grande uso na indução experimental do DM1 (NOVOSELOVA et al., 2016; OU et al., 2016; RAHIMI-MADISEH et al., 2017; SALEH et al., 2017; BORGOHAIN et al., 2017; NAHID et al., 2017).

Sua atividade diabetogênica se dá graças às suas propriedades químicas específicas. Por ser um análogo da glicose, essa molécula penetra nas células β pancreáticas via transportador de glicose GLUT-2 permitindo sua captação seletiva e acumulação (LENZEN, 2008) levando à necrose dessas células (ISLAM et al., 2017).

Seu mecanismo de ação se baseia em dois efeitos patológicos distintos: 1) inibição seletiva da secreção de insulina induzida pela glicose através da inibição específica da hexoquinase IV (glicoquinase) e 2) indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em necrose seletiva da célula β (Figura 4) (LENZEN 2008).

Figura 3 – Estrutura molecular da aloxana

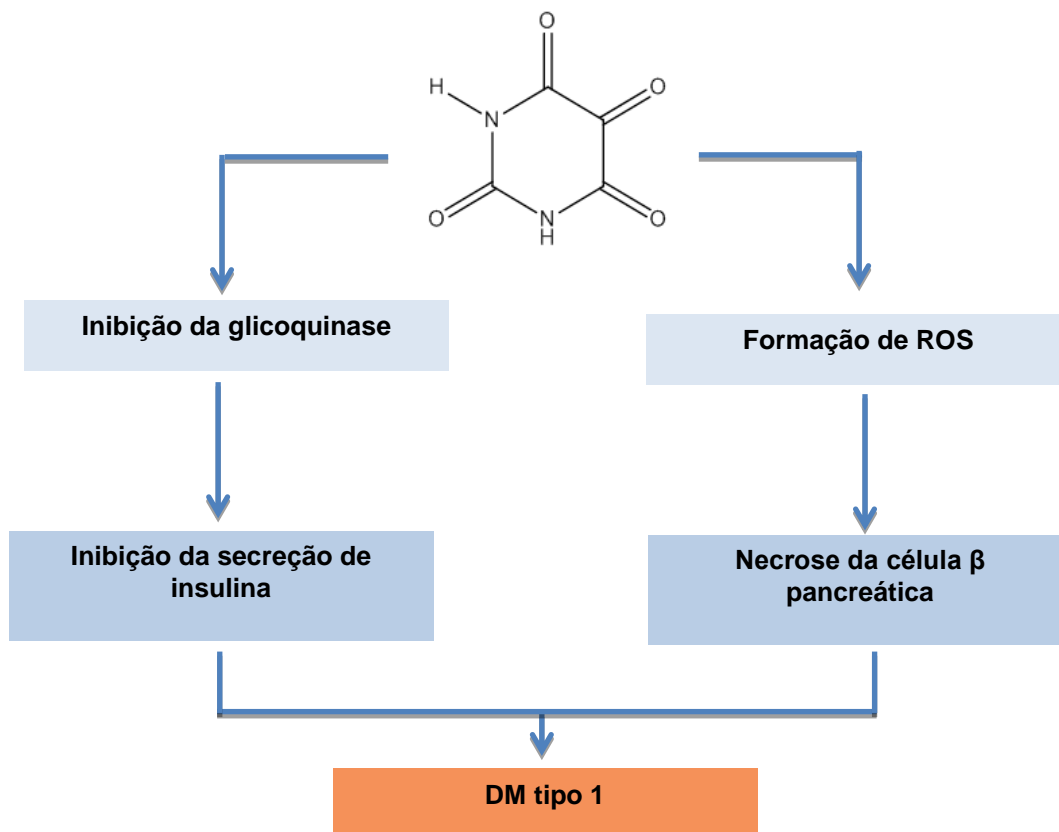


Fonte: Elaborado pelo autor.

A aloxana tem um grupo 5-carbonila central que reage com grupos sulfidril (SH). Essa característica química da aloxana permite que sua molécula tenha alta afinidade por componentes celulares que contenham esse grupo em sua estrutura, como algumas enzimas (LENZEN; PANTEN, 1988 apud RADENKOVIĆ et al., 2016; SZKUDELSKI, 2001). É o que acontece com a glicoquinase, enzima essencial para a secreção de insulina induzida pela glicose, que contém grupos sulfidril em sua estrutura e que é, portanto, muito vulnerável à ação da aloxana (LENZEN, 1987 apud SZKUDELSKI, 2001).

A inibição da glicoquinase ocorre quando a aloxana reage com dois grupos -SH no lado de ligação do açúcar da enzima, resultando na formação da ligação dissulfeto (SZKUDELSKI, 2001). Isso leva à redução da geração de ATP, suprimindo, desse modo, o sinal de ATP que desencadeia a secreção de insulina (LENZEN 2008).

Figura 4 – Mecanismos de ação diabetogênicos da aloxana



Fonte: Modificado de Al-Awar et al. (2016).

Como já mencionado, além da inibição da glicoquinase, a aloxana exerce sua ação diabetogênica por meio da destruição seletiva das células β pancreáticas pela formação de EROS (LENZEN, 2008; ISLAM et al., 2017).

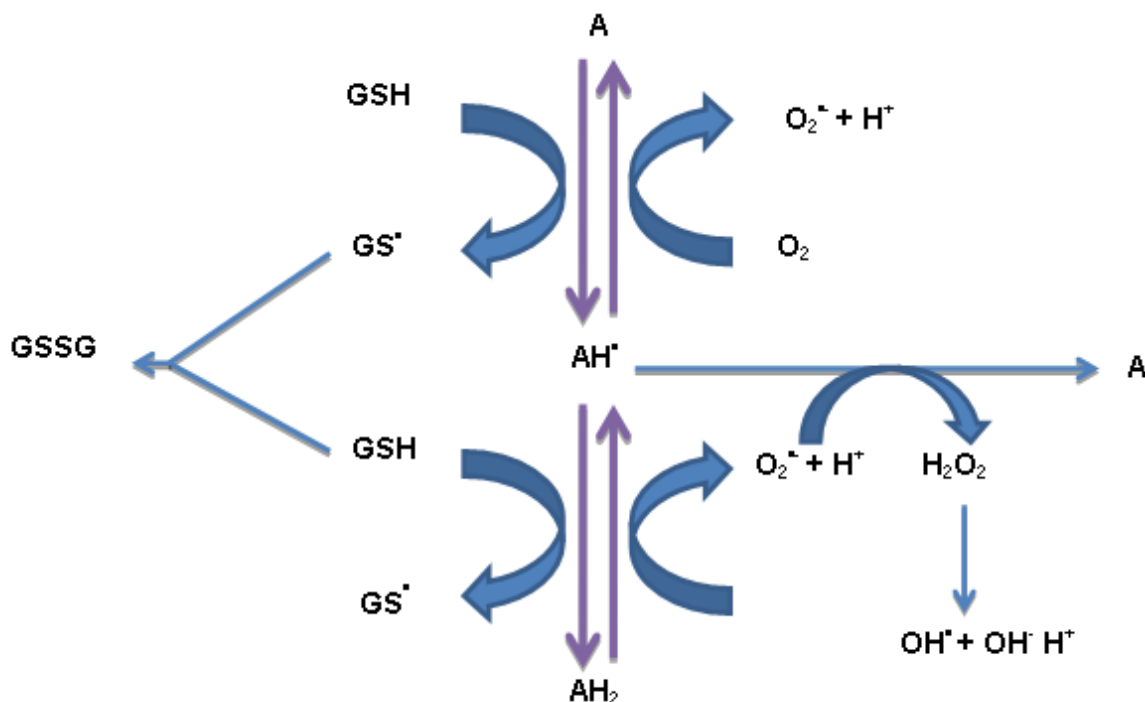
As EROS são amplamente definidas como espécies químicas contendo oxigênio com propriedades reativas que incluem os radicais livres superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (HO^{\bullet}), bem como moléculas não radicais tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas são constantemente produzidas por reações enzimáticas e não enzimáticas, sendo derivadas principalmente do oxigênio que é consumido em várias reações metabólicas que ocorrem principalmente nas mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático. Reações catalisadas por enzimas que geram EROS incluem aquelas envolvendo NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), ácido araquidônico e enzimas metabólicas como as enzimas citocromo P450, lipoxigenase e ciclooxigenase. A cadeia respiratória mitocondrial é uma fonte não enzimática de EROS (GORRINI et al., 2013).

Nos sistemas biológicos, as EROS atacam uma série de macromoléculas como proteínas, açúcares e lipídios causando uma série de reações que levam ao estresse oxidativo e o dano celular (VASCONCELOS et al., 2007). Esses danos não dependem apenas das concentrações intracelulares das EROS, mas sim do equilíbrio entre sua concentração e as espécies antioxidantes endógenas. Quando o equilíbrio pró-oxidante/anti-oxidante é perdido, o estresse oxidativo é gerado, alterando e danificando diversas moléculas intracelulares, incluindo o DNA, RNA, lipídios e proteínas (VESKOUKIS et al., 2012). Essas espécies reativas causam danos ao DNA e mal funcionamento do seu mecanismo de reparo. Além disso, a membrana celular é rica em lipídios poli-insaturados, que são susceptíveis à oxidação por EROS. Assim, essas espécies reativas promovem a peroxidação lipídica e consequentemente aumentam a permeabilidade da membrana celular, podendo assim levar à morte da célula (SOSA et al., 2013).

A geração de EROS a partir da aloxana ocorre em uma reação cíclica entre essa molécula e o seu produto de redução, o ácido dialúrico (ISLAM et al., 2017) (Figura 5).

O ácido dialúrico (AH_2) é formado a partir da redução da aloxana (A) (SZKUDELSKI, 2001), envolvendo a formação do intermediário radical aloxana (AH^\bullet) requerendo a presença de um tiol adequado, tipicamente o tripeptídeo glutathiona (GSH). O ácido dialúrico sofre autooxidação gerando radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Há ainda a formação de radicais hidroxila (OH^\bullet) via reação de Fenton, desde que haja um catalisador metálico adequado (comumente o ferro). A autooxidação do ácido dialúrico leva à formação de radical aloxana. Quando mantida sob a forma oxidada a aloxana não é citotóxica, pois não gera espécies reativas de oxigênio o que ressalta a importância da presença de tióis, como a cisteína e o GSH, para a ação diabetogênica dessa substância (LENZEN, 2008).

Figura 5 – Reações de ciclisto redox entre a aloxana e o ácido dialúrico



Fonte: Modificado de Lenzen (2008).

O quadro diabético aloxânico sofre alterações no decorrer do tempo em um processo tetrafásico. Inicialmente, 30 minutos após a sua injeção, a aloxana proporciona discreta redução da glicemia, como resultado do aumento da secreção de insulina. Em seguida, na segunda fase, ocorre retenção da insulina nas células β e aumento da glicemia, que persiste por até 4 horas após a aplicação da aloxana. Podem-se observar as primeiras alterações morfológicas das células β : dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias e a diminuição do complexo de Golgi. Posteriormente, na terceira fase, ocorre ruptura da membrana celular causando aumento da insulinemia. Isso ocorre no período de 4 a 8 horas. Alguns autores sugerem que nessa fase o experimentador ofereça glicose ao animal de maneira a se evitar uma hipoglicemia severa e consequente morte. Por fim, a quarta fase é marcada por hipoinsulinemia e hiperglicemia permanente, com lise completa das células e redução da massa das células que ocorre de forma crescente entre 9 a 144 horas, estabilizando-se em seguida. (LENZEN, 2008; LEME et al., 2010).

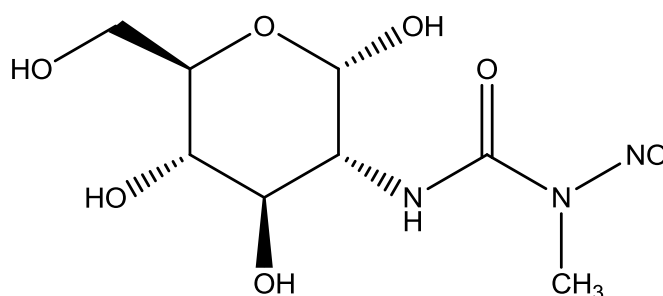
Uma grande variação e diferentes protocolos de indução são relatados e diversos fatores podem influenciar na ação diabetogênica da aloxana, dentre elas a

concentração da droga, velocidade de infusão, dose, via de administração, dieta, tempo de jejum e peso do animal (SILVA et al., 2014).

Assim como a aloxana, a STZ tem sido amplamente utilizada na indução experimental do diabetes *mellitus* (GUNDALA et al., 2016; MAHMOUD, et al., 2017; ZHANG et al., 2017; WANG et al., 2017; ANTONY et al., 2017; DHANANJAYAN et al., 2017; EL-BASSOSSY et al., 2017; CUNHA et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017).

Agente quimioterápico de ocorrência natural e de nome químico 2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureia)-1-D-glicopiranosose, a STZ é uma molécula alquilante análoga da nitrosoureia e derivada da glicosamina, que consiste em uma hexose com uma porção N-metil-N-nitrosureia (MNU) ligado ao seu carbono 2, com seletividade e toxicidade para as células β pancreáticas (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013; SARGIS, 2014; ISLAM et al., 2017) (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura molecular da estreptozotocina



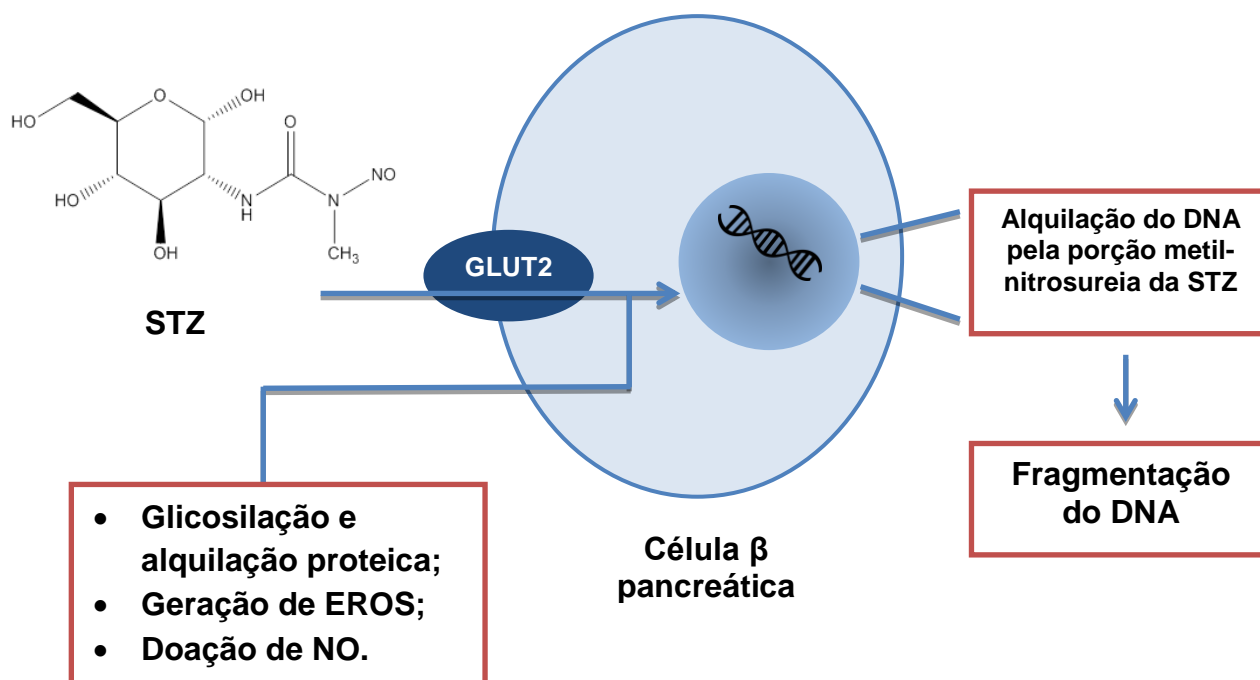
Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora os compostos de nitrosoureia sejam geralmente lipofílicos tornando muito rápida a sua captação por células, a STZ, pelo contrário, é um composto hidrofílico devido à substituição da hexose que limita a sua absorção pelas células, sendo, portanto, captada pelas células β pancreáticas via transportadores GLUT-2 (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013).

Atualmente, assume-se que a ação diabetogênica da STZ é dependente dos seguintes mecanismos: 1) alquilação do DNA; 2) glicosilação e metilação de proteínas – fatores adicionais que contribuem para ação diabetogênica da STZ, mas que não desempenham um papel essencial; 3) geração de EROS, levando ao dano celular ao interagir com macromoléculas celulares; e 4) doação de óxido nítrico a

partir do grupo nitrosureia de sua porção N-metil-N-nitrosureia (MNU) (LENZEN, 2008; ISLAM et al., 2017) (Figura 7).

Figura 7 – Mecanismos de ação diabetogênicos da estreptozotocina



Fonte: Baseado em Al-Awar et al. (2016).

O efeito citotóxico dos agentes alquilantes é principalmente devido à alquilação de bases de DNA que pode prejudicar processos essenciais, tais como replicação e/ou transcrição de DNA (BORDIN et al., 2013; PUYO et al., 2014; KR et al., 2014).

De acordo com a diversidade de danos ao DNA causados por agentes alquilantes, a resposta celular a estes fármacos é bastante complexa. Após o dano ao DNA, as células orquestram uma série de respostas que incluem o disparo de pontos de verificação de dano de DNA e bloqueio do ciclo celular. Esta detenção do ciclo celular permite um tempo adicional para o reparo do DNA. Se o reparo do DNA não for bem sucedido ou se o dano do DNA for muito abundante, as cascatas de sinalização que levam à morte celular serão ativadas (BORDIN et al., 2013).

O nitrogênio, o oxigênio e os fosfatos são alvos comuns para a alquilação, embora a especificidade da reação possa variar amplamente para diferentes agentes alquilantes. O átomo N⁷ de guanina é particularmente susceptível à alquilação. Além disso, podem ser modificados outros átomos nas bases de purina e

pirimidina do DNA, tais como os átomos N¹ ou N³ da adenina, o N³ da citosina e o O⁶ da guanina (BORDIN et al., 2013).

A STZ atua na metilação de proteínas e do DNA. Esse último mecanismo, ocorre por meio da transferência do radical metil da porção MNU dessa molécula ao DNA da célula β , especialmente na posição O⁶ da guanina. Na tentativa de reparar o DNA, a poli(ADP-ribose)polimerase (PARP) é superestimulada. Isto diminui o NAD⁺ celular, e subsequentemente os estoques de ATP. A depleção das reservas de energia celular acaba por resultar na necrose das células β . (LENZEN, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um gás de meia-vida curta, produzido endogenamente, atua como uma molécula de sinalização no corpo. Essa molécula sintetizada pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) é relativamente estável e se difunde prontamente nas células e membranas celulares onde reage com alvos moleculares. As reações precisas do NO dependem da concentração de NO obtida e de variações sutis na composição do meio intra e extracelular (CHOUDHARI et al., 2013).

As células β são particularmente sensíveis aos danos causados pelo óxido nítrico e pelos radicais livres devido aos seus baixos níveis de enzimas de eliminação de radicais livres (SINGH et al., 2001; FRIEDERICH et al., 2009; SPINNAS, 1999 apud ELEAZU et al., 2013).

Assim como na indução do DM usando aloxana, a indução feita com STZ também pode sofrer interferência de alguns fatores capazes de alterar o efeito da droga e a sensibilidade do animal à sua ação diabetogênica. Esses fatores estão relacionados à própria substância, bem como à metodologia de indução ou ao animal usado no experimento. Dentre esses fatores podem-se citar a linhagem, a dieta e o ritmo circadiano do animal (DEEDS et al., 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi testar os efeitos diabetogênicos da STZ e da aloxana, frente às células β pancreáticas de ratos *Wistar* e buscando uma contribuição para o aprimoramento da indução experimental do diabetes *mellitus* que permitisse o fornecimento de um maior suporte de detalhes experimentais que facilitem a outros experimentadores a execução desejada dos experimentos sem que haja a necessidade adicional de pré-testes, importante para que se evite o uso adicional de animais, foi proposto nesse trabalho uma análise comparativa das induções de DM utilizando aloxana e STZ com protocolos estabelecidos com base em artigos e outras referências científicas e em testes-piloto realizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Verificar qual das técnicas de indução química, pela aloxana ou pela STZ é a mais satisfatória, comparando a relação desenvolvimento da doença/mortalidade e custo da indução, em ratos *Wistar*.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de indução química pela aloxana e pela STZ em ratos;
- Comparar o tempo de sobrevivência dos animais induzidos com aloxana e com STZ;
- Observar o desenvolvimento do diabetes induzido nos animais através da medida de ingestão de água, ração e do volume de urina excretado bem como verificar o decaimento físico (complicações da doença);
- Comparar a histopatologia do pâncreas, rins e fígado dos animais do grupo controle e experimental ao final do experimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Locais de pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no biotério Prof. Thomas George, no Laboratório de Psicofarmacologia Prof. Elizaldo Carlini (PsiFARM) situados no Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), no Laboratório UNILAB e na Escola Técnica de Saúde do Centro de Ciências da Saúde da UFPB.

4.1.2 Substâncias utilizadas

Aloxana (*Alloxan monohydrate*, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), estreptozotocina (*Streptozotocin*, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), água purificada Milli-Q, Solução salina 0,9%, Xilasina (Anasedan[®]), Cetamina (Ketamin[®] - Cristália).

4.1.3 Animais e condições experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) normoglicêmicos, machos, adultos (faixa etária próxima de 90 dias), com peso entre 210 e 250 g e saudáveis ao exame clínico, obtidos do biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas metabólicas, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à alimentação (tipo *pellets* de ração da marca Purina[®]) e água potável *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas (06h00 às 18h00 horas). Todas as atividades experimentais obedeceram aos princípios de cuidados com animais, aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IPeFarM/UFPB sob certidão nº 166/2015 (Anexo). Os animais foram sacrificados ao final do período de experimentação, obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013) vigentes para o período de realização das atividades de pesquisa.

4.1.4 Aparelhagem

Glicosímetro (Accu-Chek® Active), balança digital (Gehaka®, BE 4001).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Indução química do Diabetes *mellitus* tipo 1

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo controle constituído de 06 animais (n=6), grupo teste ALX (TALX) e grupo teste STZ (TSTZ), ambos constituídos de 10 animais (n=10). Após jejum alimentar e fornecimento de água *ad libitum* os animais do grupo controle foram submetidos a uma injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% ou água purificada Milli-Q. Os animais do grupo TALX foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de aloxana na dose de 120 mg/kg de peso do animal. Os animais do grupo TSTZ foram submetidos a uma única injeção intraperitoneal de STZ na dose de 60 mg/kg de peso do animal.

4.2.2 Indução com uso de estreptozotocina

Realizou-se pesagem da STZ em ambiente escuro ao abrigo da luz. Solubilizou-se, aos poucos, a STZ em água purificada Milli-Q.

Protegeu-se o recipiente, contendo essa preparação, da ação de luz envolvendo-o com papel alumínio e reservou-se essa preparação em condições refrigeradas.

Esse procedimento foi realizado imediatamente antes à administração da substância.

Após jejum sólido de 15 horas, realizou-se a administração de STZ na dose de 60 mg/kg de peso por via intraperitoneal (i.p.). Após isso, forneceu-se água *ad libitum* e ração (imediatamente após a administração da droga).

4.2.3 Indução com uso de aloxana

Imediatamente antes à administração, realizou-se lentamente a solubilização da aloxana em solução salina 0,9%.

Após jejum sólido de 22 horas, realizou-se a administração de aloxana na dose de 120 mg/kg de peso por via intraperitoneal (i.p.). Após isso, forneceu-se água *ad libitum*, sendo a ração fornecida apenas 2 horas e 30 minutos após a indução.

4.2.4 Avaliação clínica dos animais saudáveis e diabéticos

Antes da indução química do diabetes *mellitus* (Momento 0 – M0) realizou-se um corte na extremidade da cauda do animal, em jejum, para coleta de uma gota de sangue para avaliação glicêmica com auxílio de glicosímetro. Os animais que apresentaram glicemia entre 50-135 mg/dL (HARKNESS & WAGNER, 1993) foram considerados normoglicêmicos e submetidos à indução química do diabetes *mellitus*. Após 72 horas da indução (Momento 1 - M1), uma nova avaliação glicêmica foi realizada para confirmação da doença, sendo considerados diabéticos os ratos que apresentaram glicemia de jejum maior do que 200 mg/dL.

Após avaliação glicêmica em M1, foram fornecidos água e ração aos animais diabéticos, dando-se início ao período de monitorização de trinta (30) dias, onde foram avaliados diariamente os consumos de água (mL) e ração (g), volume urinário individual (mL) e condição da pelagem e outras manifestações clínicas associadas à doença.

4.2.5 Análise histopatológica de rins, fígado e pâncreas dos animais saudáveis e diabéticos

Os animais sobreviventes ao período de monitorização dos grupos controle e tratados tiveram os órgãos excisados (pâncreas, fígado, rins) e seccionados, fixados em formalina (solução de formol a 10 %) tamponada e após 24 horas, foram resseccionados para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo convencional (LEIKA®), os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico. Os procedimentos descritos foram realizados na Escola Técnica de Saúde da UFPB, sob colaboração da profa. Claudenice R. do Nascimento e no laboratório UNILAB sob colaboração do Prof. Dr. Ivan Rodrigues de Carvalho Filho.

4.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e desvio padrão da média e analisados estatisticamente utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA *one-way*), seguido do pós-teste de Tukey e as diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando apresentaram $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Indução do diabetes *mellitus* usando dose única intraperitoneal de aloxana e estreptozotocina

Os resultados de glicemia de jejum no momento M1 (72 horas após a indução), permitiram a observação do número de animais diabéticos, não diabéticos e que vieram a óbito (Tabela 1) após a administração de dose única de 120 mg/kg de aloxana (i.p) e de 60 mg/kg de STZ (i.p), grupos (TALX) e (TSTZ), respectivamente.

Tabela 1 – Número e percentuais de animais diabéticos sobreviventes, animais não diabéticos e óbitos de ratos submetidos à injeção intraperitoneal de aloxana (120 mg/kg) ou estreptozotocina (60 mg/kg)

Grupos	Diabéticos	Não diabéticos	Óbitos	Total
TALX ^a	05 (50%)	02 (20%)	03 (30%)	10 (100%)
TSTZ ^b	09 (90%)	01 (10%)	00 (00%)	10 (100%)

^aTALX: Teste aloxana

^bTSTZ: Teste estreptozotocina

5.2 Consumo de água e ração e volume urinário

Foi observado aumento significativo no consumo de água (Tabela 2, Gráfico 1), ração (Tabela 2, Gráfico 2) e no volume urinário (Tabela 2, Gráfico 3) dos animais do grupo TALX e do grupo TSTZ, quando comparado ao grupo controle durante os 30 dias de acompanhamento.

Tabela 2 - Consumo de água, ração e volume de urina de animais diabéticos e saudáveis

	Controle	TALX ^a	TSTZ ^b
Água (mL)	50,6 ± 15,9	209,6 ± 5,7*	220,4 ± 5,7*
Ração (g)	29,9 ± 2,7	43,5 ± 3,7*	48,3 ± 1,2*, #
Urina (mL)	3,3 ± 1,4	144,4 ± 5,9*	156,7 ± 5,5*

Dados apresentados como a média ± d.p. do grupo controle: n=6; ALX: n=5; STZ: n=9, analisados por ANOVA *Oneway* com pós-teste de Tukey.

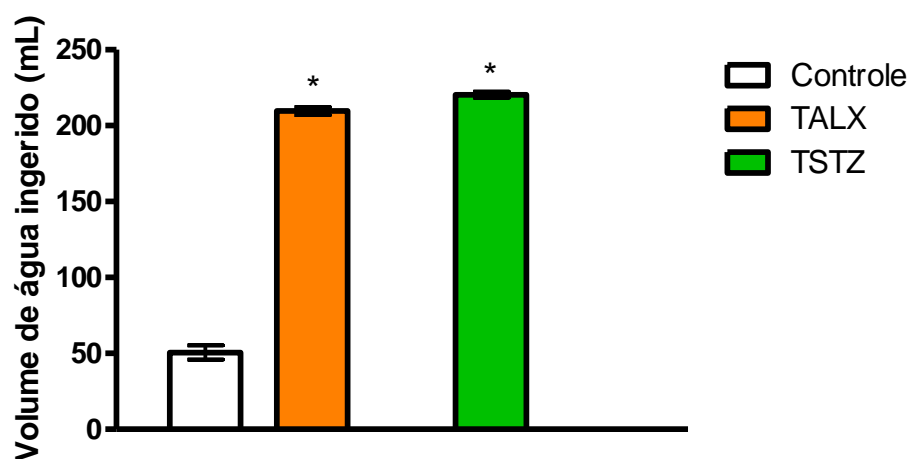
^aTALX: Teste aloxana

^bTSTZ: Teste estreptozotocina

*p<0,05 significativo controle vs teste

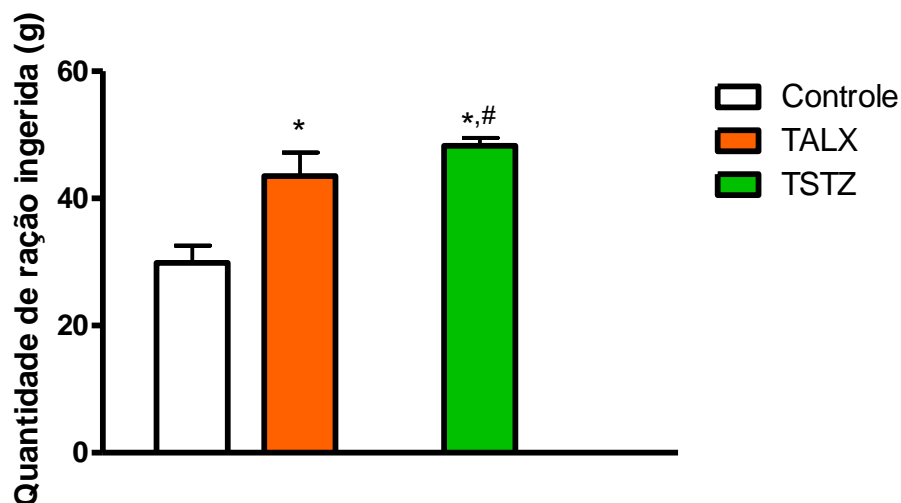
#p<0,05 significativo TSTZ vs TALX

Gráfico 1 - Efeito de aloxana e estreptozotocina sobre o volume de água ingerido pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle



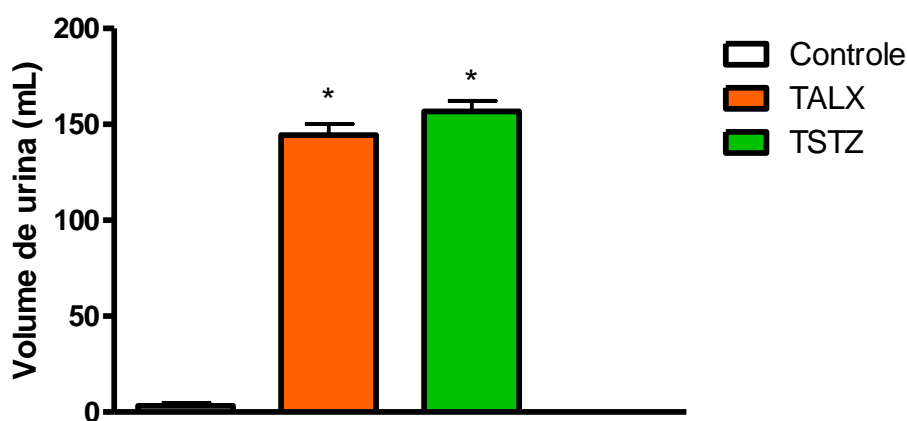
*p<0,05 comparação entre o grupo controle e os grupos teste ALX e STZ

Gráfico 2 – Efeito de aloxana e estreptozotocina sobre a quantidade de ração consumida pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle



* $p < 0,05$ comparação entre o grupo controle e os grupos teste ALX e STZ. # $p < 0,05$ comparação entre os grupos teste ALX e STZ.

Gráfico 3 – Efeito de aloxana e estreptozotocina sobre o volume de urina excretado pelos grupos teste durante 4 semanas em relação ao grupo controle



* $p < 0,05$ comparação entre o grupo controle e os grupos teste ALX e STZ.

5.3 Evolução do peso corporal dos animais dos animais saudáveis e diabéticos

Observou-se, como esperado, perda significativa do peso dos animais doentes de ambos os grupos submetidos à indução química do diabetes *mellitus*, quando

comparado ao grupo controle, em todos os momentos de avaliação, cujos resultados estão expressos na tabela 3 e no gráfico 4.

Tabela 3 – Evolução ponderal, em gramas, de ratos induzidos ao diabetes com aloxana e estreptozotocina

	Controle	TALX ^a	TSTZ ^b
Basal	231,3 ± 9,2	233,0 ± 12,6	232,7 ± 10,3
7 dias	248 ± 24,4	222,0 ± 9,8	212,3 ± 13,1*
14 dias	276,5 ± 15,5	210,0 ± 24,0*	181,6 ± 24,7*
21 dias	287,6 ± 16,6	200,0 ± 26,3*	176,4 ± 23,5*
28 dias	289,2 ± 20,9	165,0 ± 36,3*	172,8 ± 33,5*

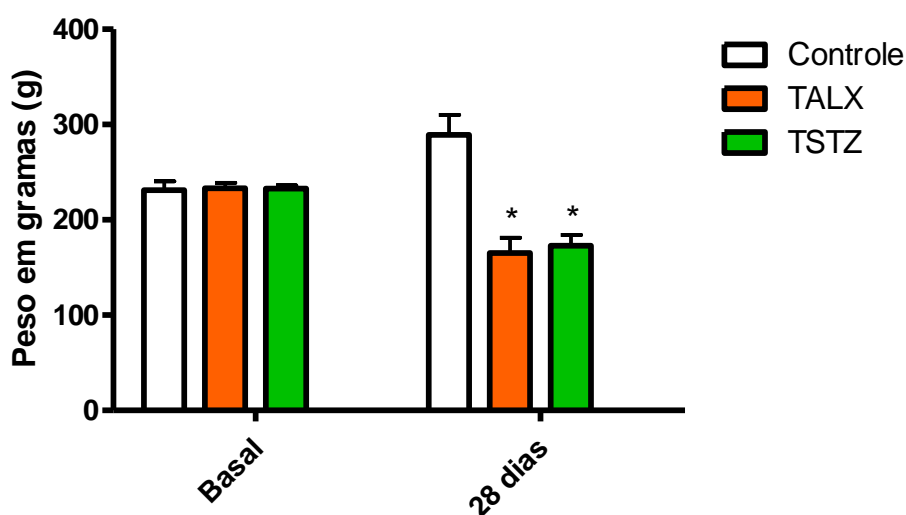
Dados apresentados como a média ± d.p. do grupo controle: n=6; ALX: n=5; STZ: n=9, analisados por ANOVA *Oneway* com pós-teste de Tukey.

^aTALX: Teste aloxana

^bTSTZ: Teste estreptozotocina

**p* < 0,05 comparado ao controle.

Gráfico 4 – Efeito do tratamento de ratos com aloxana e estreptozotocina sobre o peso em gramas



Oneway ANOVA com pós teste de Tukey. **p* < 0,05 comparação entre o grupo controle e teste ALX e teste STZ.

5.4 Avaliação glicêmica dos animais dos animais saudáveis e diabéticos

A avaliação semanal da glicemia permitiu observar diferenças significativas nos índices glicêmicos dos animais. Os animais dos grupos TALX e TSTZ, apresentaram aumento significativo dos seus valores de glicemia de jejum, quando comparado ao grupo controle, em todos os momentos de avaliação (Tabela 4 e Gráfico 5).

Tabela 4 – Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais diabéticos e saudáveis

	Controle	TALX ^a	TSTZ ^b
Basal	92,2 ± 7,4	77,2 ± 16,9	80,4 ± 15,7
7 dias	91,5 ± 2,9	434,4 ± 133,6*	402,2 ± 32,7*
14 dias	86,3 ± 13,4	437,0 ± 76,6*	400,0 ± 125,288
21 dias	86,8 ± 9,1	373 ± 122,8*	449,1 ± 148,0*
28 dias	101,5 ± 9,9	491,8 ± 117,9*	459,8 ± 199,1*

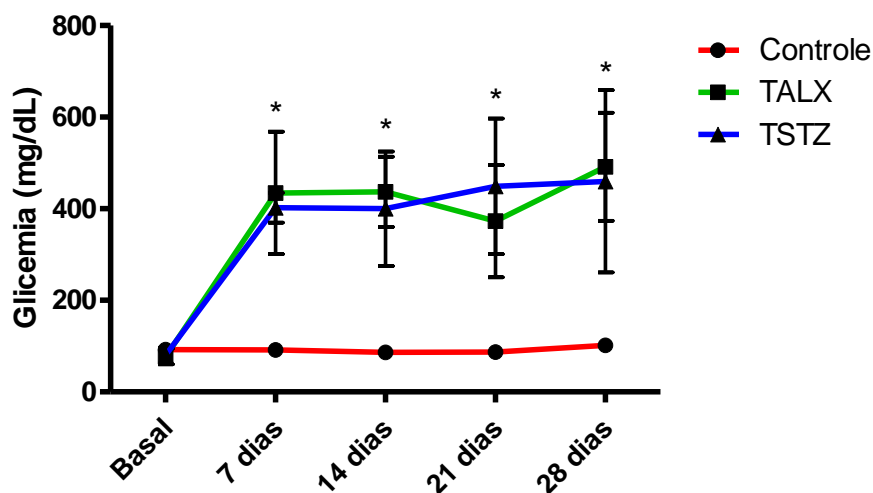
Dados apresentados como a média ± d.p. do grupo controle: n=6; ALX: n=5; STZ: n=9, analisados por Teste T de Student.

^aTALX: Teste aloxana

^bTSTZ: Teste estreptozotocina

*p<0,05 Controle vs teste

Gráfico 5 – Valores glicêmicos de animais controle e diabéticos induzidos com aloxana e estreptozotocina

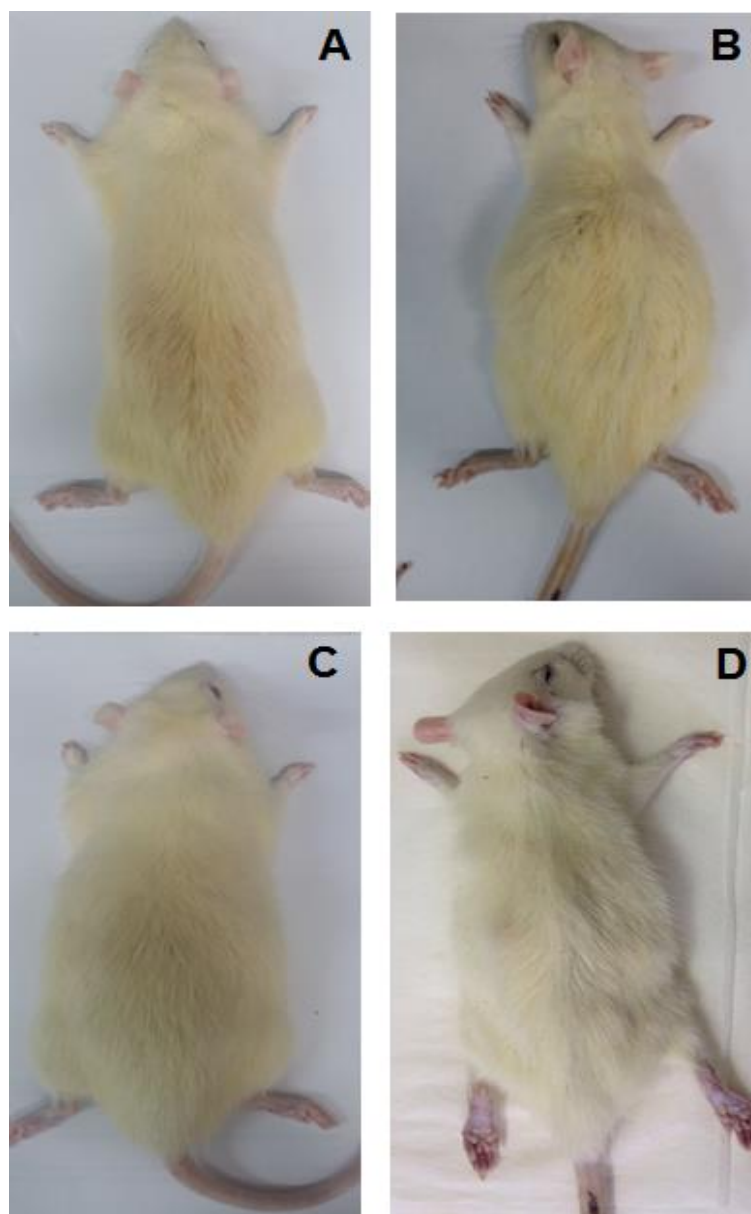


Dados apresentados como a média ± d.p de Controle n=6; TALX n=5 e TSTZ n=9 analisados por ANOVA Oneway com pós-teste de Tukey.*p<0,05 Controle vs teste.

5.5 Avaliação clínica dos animais saudáveis e diabéticos

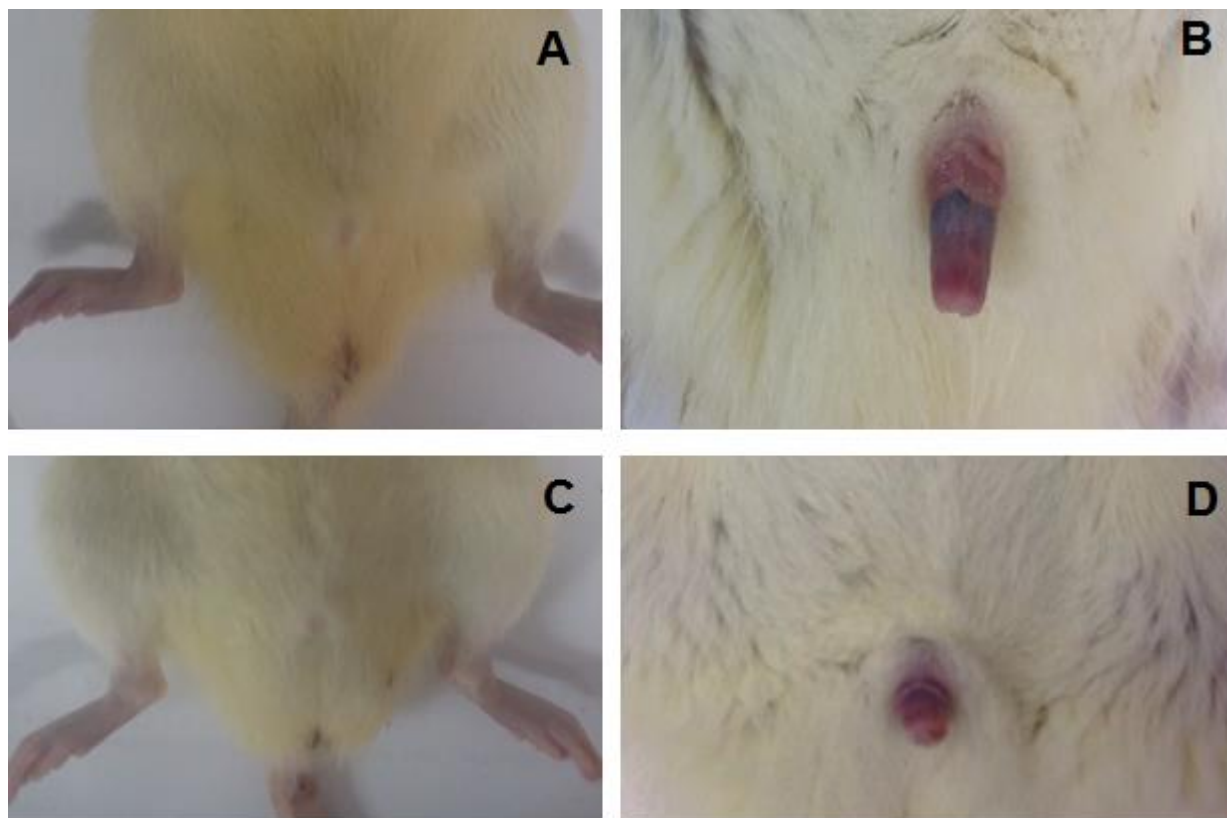
A avaliação clínica dos animais permitiu observar debilidade física e alterações de pelagem e no órgão genital dos animais diabéticos. Não evidenciou-se nenhuma alteração clínica nos animais do grupo controle (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Condição física de animais do grupo controle, TALX e TSTZ



Legenda: Ratos saudáveis do grupo controle **(A)** e **(C)**; Rato diabético do grupo TALX apresentando-se caquético, com distensão abdominal e com alteração de pelagem **(B)** e rato diabético do grupo TSTZ, apresentando-se debilitado, caquético e com alteração de pelagem **(D)**.

Figura 9 – Alteração peniana presente em animais diabéticos induzidos com aloxana e estreptozotocina

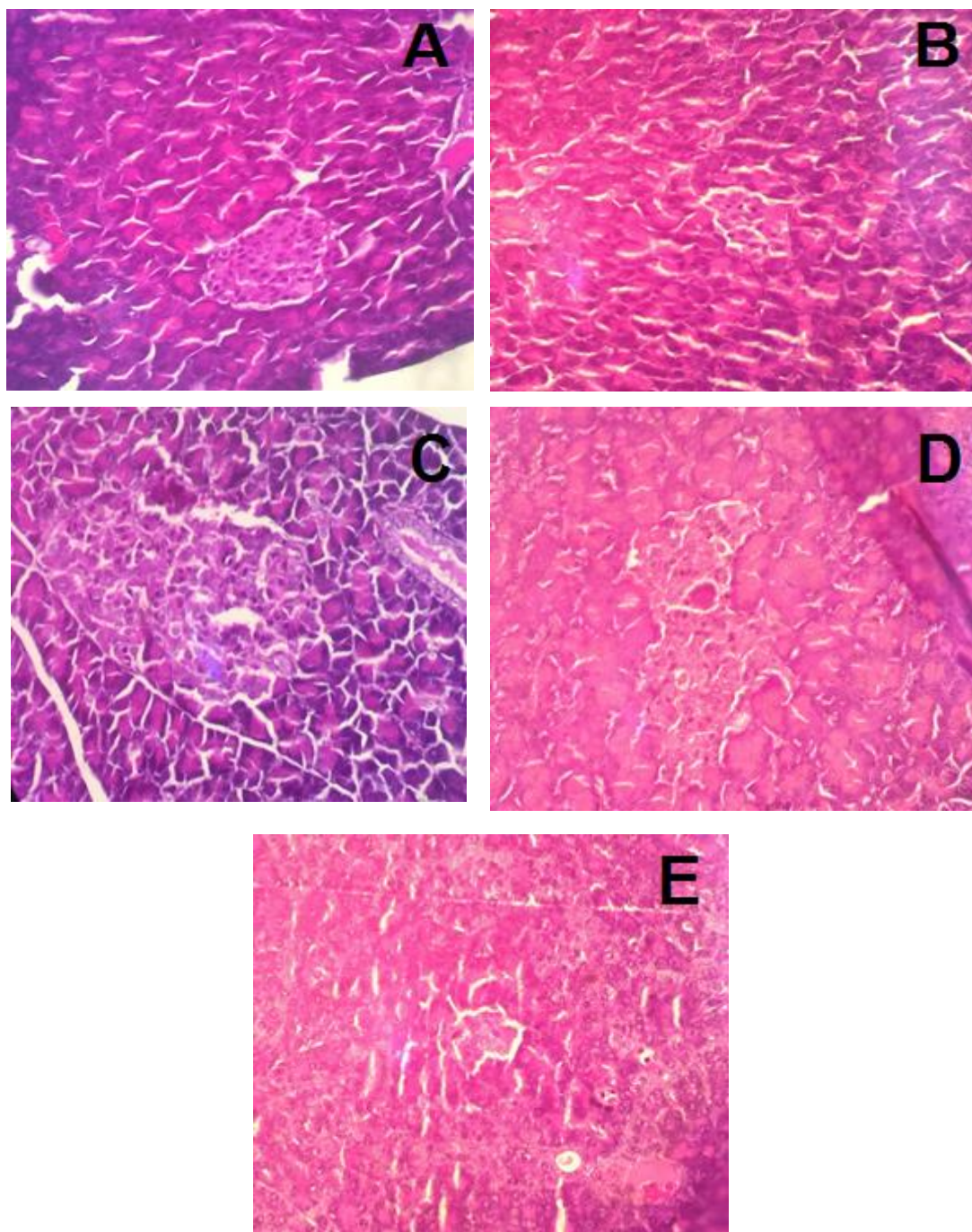


Legenda: Ratos saudáveis do grupo controle (A) e (C); Diagnóstico sugestivo de balanite em animal diabético induzido com aloxana (120 mg/dL) (i.p) (B) e com estreptozotocina (60 mg/dL) (i.p) (D).

5.6 Análise histopatológica de rins, fígado e pâncreas dos animais saudáveis e diabéticos

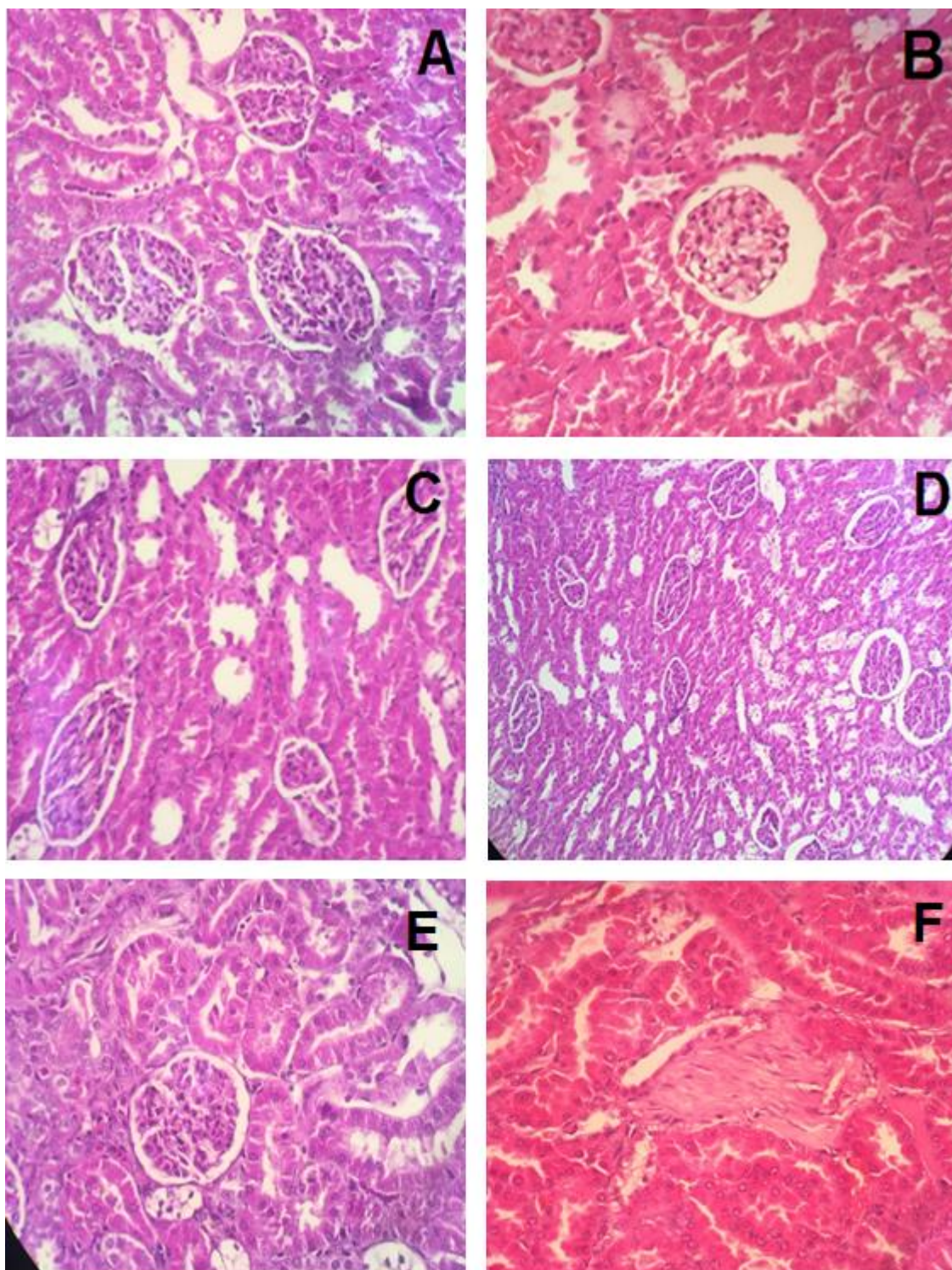
A análise histopatológica dos órgãos revelou alterações nas ilhotas de Langerhans (Figura 10), nos glomérulos renais (Figura 11) e reação inflamatória com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares em fígados (Figura 12) de animais diabéticos. A histologia dos órgãos dos animais do grupo controle encontrou-se preservada.

Figura 10 – Análise histológica dos pâncreas dos animais diabéticos e saudáveis



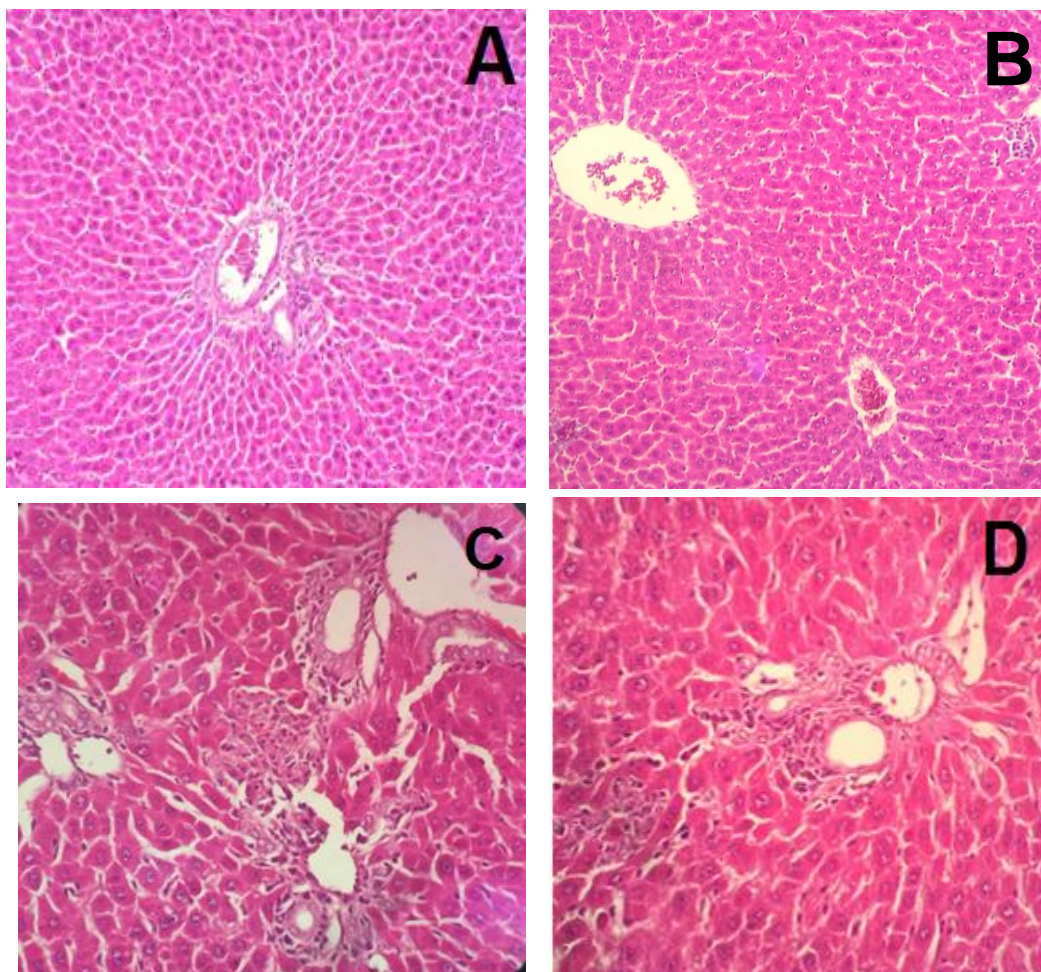
Legenda: Ilhotas de Langerhans. **(A)** Controle; **(B)** e **(C)** Grupo TALX; **(D)** e **(E)** Grupo TSTZ. Corante H.E, 400x

Figura 11 – Análise histológica dos rins dos animais diabéticos e saudáveis



Legenda: Glomérulos renais em **(A)** Controle; **(B)** - **(D)** Grupo TSTZ; **(E)** Grupo TALX; **(F)** Cicatriz fibrótica em Grupo TSTZ. **A, B, C, E, e F** – H.E, 400x; **D**, - H.E, 200x.

Figura 12 – Análise histológica dos fígados dos animais diabéticos e saudáveis



Legenda: **(A)** e **(B)** Controle; **(C)** Grupo TSTZ; **(D)** Grupo TALX. **A** e **B** – H.E, 200x; **C** e **D** – H.E, 400x

6 DISCUSSÃO

Devido ao aumento da prevalência de diabetes *mellitus* (DM) em todo o mundo, acredita-se que os modelos de ratos diabéticos desempenham um papel importante na elucidação da patogênese do diabetes humano e das suas complicações, tais como retinopatia, nefropatia e neuropatia e na investigação e desenvolvimento de novas drogas para diabetes e suas complicações (AL-AWAR, 2016).

Os artigos científicos relatam que a indução de diabetes *mellitus* em ratos pode ser facilmente realizada por produtos químicos diabetogênicos conhecidos, tais como aloxana ou STZ, por procedimentos simples que podem ser reproduzidos com sucesso em laboratórios de investigação (SRINIVAS, 2015). No entanto, não existe um protocolo padrão que foi unanimemente aceito pela comunidade científica (RADENKOVIĆ et al., 2016).

Este trabalho propôs um estudo comparativo da indução experimental do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) com aloxana e STZ em ratos *Wistar* após extensiva pesquisa realizada em portais científicos disponíveis na internet (PubMed, Google Acadêmico, Periódico Capes e outros). Nela, pôde ser observado que há uma maior prevalência de artigos utilizando a STZ em comparação à aloxana para a indução em roedores.

Apesar do uso mais disseminado dessa droga na indução química dessa doença, diversos pesquisadores têm relatado no portal *Research Gate*, dificuldades para indução do DM1 com o uso de STZ (baixo número de animais doentes e elevadas taxas de mortalidade, por exemplo), contradizendo alguns autores que afirmam que algumas metodologias de indução com uso dessa substância são simples, baratas, rápidas e eficazes (THULESEN et al, 1997; HOLEMANS et al, 1997; AL-HARIRI, 2012) com menor toxicidade geral que a aloxana (LERCO et al., 2003).

Desta forma, surgiu o seguinte questionamento: A indução pela STZ é mesmo mais satisfatória (aquela que induz o quadro de diabetes num maior número de animais, com menor percentual de óbitos) do que aquela na qual se usa aloxana?

Ainda, assim como mencionado por Deeds e colaboradores (2011) percebeu-se, em nossa pesquisa, que há uma variação muito grande nas metodologias de indução, não havendo um protocolo padrão que responda aos principais problemas

como preparação das substâncias, a via e o intervalo de administração, a dose escolhida, a manipulação laboratorial das substâncias selecionadas, a taxa de sucesso, a taxa de mortalidade (RADENKOVIĆ et al., 2016) e outras peculiaridades técnicas da indução de DM1 usando aloxana e STZ.

Diversas dificuldades relatadas no *Research Gate* eram compartilhadas pela equipe do laboratório de psicofarmacologia (PsiFARM/IPeFarM/UFPB), mostrando a necessidade de elaboração de um protocolo para a indução do DM1 em ratos usando a STZ.

Para tanto, estudos piloto que permitissem o delineamento experimental foram realizados no biotério Prof. Thomas George (IPeFarM/UFPB), onde foram considerados os seguintes parâmetros para padronização: 1) escolha da espécie, gênero animal e faixa de peso; 2) condições ideais para manutenção da estabilidade das substâncias; 3) modo de preparo da solução; 4) tempo de jejum antes da indução; 5) dose adequada para esse modelo (maior número de animais doentes com menor número de mortes); 6) veículo; e 7) tempo de reposição dos *pellets* pós indução do diabetes.

Definidos os protocolos de indução, deu-se início a realização da avaliação da atividade diabetogênica da aloxana e STZ frente às células β de ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*). A escolha desses animais baseou-se no seu manuseio fácil e prático, no seu baixo custo de manutenção, na sua maior resistência às infecções, na facilidade para remoção dos diversos órgãos estudados (LERCO, 2003; BIGHETTI, 2011) e por serem largamente utilizados no campo de pesquisa do DM1 usando aloxana ou STZ (DAS et al., 2012; OLIVEIRA, 2015; SAMARGHANDIAN et al. 2016; CUNHA et al., 2017; DHANANJAYAN et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017; RAHIMI-MADISEH et al., 2017; KOLSI et al., 2017; RAMADAN et al., 2017; CHERBAL et al., 2017; AL MAMUN et al., 2017).

Revisando trabalhos recentes, foi observado o uso frequente de ratos *Wistar* machos, em modelo de diabetes experimental induzido quimicamente com STZ e aloxana, com faixa de peso compreendida entre 210 e 250 gramas (BHATTA; VEERANJANEYULU et al., 2014; KIM et al., 2014; FARSANI et al., 2015; ASRI-REZAEI et al., 2015; BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2017; KIASALARI et al., 2017). De acordo com Lukens (1948), existe uma relação entre a sensibilidade do animal aos efeitos diabetogênicos da aloxana e o peso corpóreo. Para cada unidade de peso do rato existe um aumento de 0,73 poderes de toxicidade da aloxana.

Portanto, animais adultos (3 meses de idade), porém jovens, têm peso menor e requerem doses menores, também.

Em protocolo desenvolvido por Dias e colaboradores (2011), foi observado que uma dose única de aloxana 120 mg/kg de peso corporal em solução salina 0,9% por via intraperitoneal (i.p) em ratas *Wistar*, com jejum prévio de 24 horas, foi capaz de levar a indução de diabetes grave (> 200 mg/dL) em 61,2% dos animais. Neste protocolo, a ração foi fornecida apenas 1 hora e 30 minutos após a administração da aloxana. Silva e colaboradores (2014) em estudo comparativo da indução de DM1 usando diferentes doses de aloxana em ratas *Wistar* (120, 150 e 200 mg/kg de peso corporal em solução salina 0,9%, i.p) com jejum prévio de 24 horas, verificou que a dose de 120mg/kg comparada às demais doses foi mais eficiente, por induzir os sinais clínicos e laboratoriais da doença em um maior número de animais com menor índice de óbitos. Estudo de Oliveira (2012) também mostra a eficácia da dose de 120 mg/kg i.p em ratas, quando comparada a dose de 200 mg/kg i.p que, apesar de também induzir uma alta taxa de animais com diabetes grave, também induz a um maior índice de óbito comparado a dose de 120 mg/kg de peso corporal.

Em estudo comparativo da taxa de indução de diabetes *mellitus* com STZ utilizando diferentes solventes em ratos machos realizada por Al-Hariri (2012) foi demonstrado que a administração intraperitoneal de uma única dose de STZ (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em água destilada pôde ser utilizada como um método alternativo para a indução mais rápida de DM no desenho diabético experimental tendo ele algumas vantagens, incluindo simplicidade, rapidez e eficácia.

Considerando os sucessos experimentais relatados nesses trabalhos e os observados nas induções dos nossos testes-piloto, determinou-se que para a indução com uso de aloxana a dose utilizada seria 120 mg/kg (i.p), dissolvida em solução salina a 0,9% com 22 horas de jejum prévio e fornecimento de ração apenas 1 hora e 30 minutos após a indução. Já em relação à indução com STZ, determinou-se que a dose utilizada seria 60 mg/kg dissolvida em água purificada Milli-Q com 15 horas de jejum prévio e fornecimento imediato de ração após a injeção intraperitoneal da droga.

Com base na medida de glicemia de jejum, 72 horas após a indução (momento M1), pôde-se determinar o número de animais diabéticos e não diabéticos. Considerando que a faixa de normalidade para os níveis glicêmicos dessa espécie

encontra-se entre 50 e 135 mg/dL (HARKNESS; WAGNER, 1993) e que valores acima de 200 mg/dL confirmam o diagnóstico de diabetes (SBD, 2016), encontrou-se que entre os 10 animais induzidos com aloxana, 50% encontraram-se diabéticos, 30% vieram a óbito antes da confirmação da doença no momento M1 e que 20% dos animais não ficaram diabéticos com a administração da dose única de 120 mg/kg de aloxana, via intraperitoneal.

Em se tratando da indução com STZ, dos 10 animais induzidos com a dose única de 60 mg/kg i.p, 90% ficaram diabéticos e apenas 10% não apresentaram glicemia de jejum > 200 mg/dL. Neste grupo, não foram observadas mortes nas primeiras 72 horas de indução.

Entre os 06 animais do grupo controle, nenhum apresentou glicemia com valores maiores que 200 mg/dL.

No teste piloto, os animais induzidos com aloxana e STZ foram mantidos em caixas coletivas de polietileno em condições padrão de laboratório e a porcentagem de indução de diabetes e o tempo de sobrevivência foram semelhantes entre os grupos. Este resultado prévio levou à hipótese de que não haveria diferença significativa entre a indução utilizando aloxana ou STZ em ratos.

Nos testes piloto realizados para a padronização da utilização da aloxana, foi observado 100% de sucesso de indução nos animais testados, sem nenhuma morte até as 72 horas para confirmação da doença.

O menor percentual de animais diabéticos observado no grupo submetido à indução com aloxana (TALX), quando comparado ao grupo submetido à injeção de STZ (TSTZ), pode ser explicado por um dos diversos fatores que podem influenciar os efeitos diabetogênicos da substância: a sua baixa estabilidade.

A aloxana é uma substância instável. Sua meia-vida a pH neutro e 37 °C é de cerca de 1,5 minutos e é mais longa em temperaturas mais baixas (LENZEN; MUNDAY, 1991 apud SZKUDELSKI, 2001). Problemas técnicos no fornecimento de energia do IPeFarM, em dias anteriores à indução com aloxana levou à falta de refrigeração e, conseqüentemente, ao aumento da temperatura da geladeira na qual a substância estava armazenada, por tempo desconhecido por parte dos experimentadores. Esse fato pode ter contribuído para perda da estabilidade da droga e, conseqüentemente, redução do número de animais diabéticos pela ação da aloxana. Faz-se necessário mencionar o fato de que as condições de manutenção dos animais diferiram do teste piloto para o experimental definitivo: no teste piloto os

animais ficaram agrupados na gaiola de polietileno enquanto que no experimental, os animais foram mantidos isolados nas gaiolas metabólicas. No período de adaptação de 48 horas, quando os animais foram retirados da caixa coletiva para a gaiola metabólica individual, observou-se uma perda de peso estimada em aproximadamente 20 g por animal. Esse fato retrata o quanto os animais tornam-se sensíveis quando encontram-se isolados e em um ambiente desconhecido, podendo, assim, interferir em sua sensibilidade à ação tóxica da aloxana.

Na avaliação clínica da doença foi possível observar que a evolução do peso, diurese e ingestão de água e ração, bastante importantes na avaliação clínica do diabetes *mellitus*, desenvolveram-se caracteristicamente e conforme o esperado nos dois grupos de animais doentes (TALX e TSTZ), evidenciando-se emagrecimento, poliúria, polidipsia e polifagia compatíveis com os achados da literatura. Foram observados também alteração na pelagem que apresentou-se eriçada e sem brilho, forte odor na urina e balanite. Os animais do grupo controle não apresentaram nenhuma alteração clínica durante o período de acompanhamento.

A avaliação da média de peso dos animais doentes permite a observação de perda significativa em relação ao peso do dia da indução. Os animais diabéticos do grupo TALX apresentaram uma perda média de $63,8 \pm 44,5$ g, entre a primeira e quarta semana. A perda média de peso dos animais do grupo TSTZ foi de $59,9 \pm 36,1$ g, entre a primeira e quarta semana de acompanhamento. Os animais do grupo controle apresentaram ganho de peso durante as quatro semanas de experimento. Não foi observada diferença significativa de perda de peso entre os grupos TALX e TSTZ.

Sabe-se, que a deficiência de insulina promove uma diminuição na síntese proteica acarretando em um acelerado catabolismo que reflete em perda de massa muscular (PEREIRA, 2008) e consequente perda de peso.

Ao comparar os valores do consumo médio diário de água e ração dos animais do grupo TALX aos do controle (água: $50,6 \text{ mL} \pm 15,9$ e ração: $29,9 \pm 2,7$ g), observa-se um aumento significativo dos animais desse grupo, sendo de $209,6 \pm 5,7$ mL e $43,5 \pm 3,7$ g, respectivamente. Também foram observados no grupo TSTZ, consumos médios de água e ração significativamente elevados, quando comparado ao grupo controle, sendo de $220,4 \pm 5,7$ mL e $48,3 \pm 1,2$ g, respectivamente. Esses resultados permitem a caracterização de polidipsia e polifagia entre os animais

diabéticos de ambos os grupos, TALX e TSTZ. Esses resultados permitiram ainda, perceber que os consumos de água e ração dos animais do grupo TSTZ não foram significativamente maiores quando comparados ao grupo TALX.

A medida do volume de urina de 24 horas permitiu a observação de um aumento significativo da diurese dos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle, sendo $144,4 \pm 5,9$ mL do grupo TALX, $156,7 \pm 5,5$ mL do grupo TSTZ e $3,3 \pm 1,4$ mL do grupo controle.

Não houve diferença significativa da diurese dos animais do grupo TSTZ comparados aos animais do grupo TALX. Esses resultados permitem a caracterização de poliúria nesses animais.

O aumento da ingestão de água, ou polidipsia, presente nos animais diabéticos deve-se à hiperosmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa (LERCO, 2003).

Já a polifagia, é resultado da ativação do centro regulador do apetite no hipotálamo decorrente do quadro de inanição apresentado pelo indivíduo diabético, que é causado pela deficiência de insulina e da consequente diminuição da utilização da glicose como fonte principal de energia (PEREIRA, 2008).

A polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso observados nos dois grupos de animais doentes mostram-se compatíveis ao encontrado em outros trabalhos de indução do diabetes utilizando aloxana (LERCO et al., 2003; SILVA; NOGUEIRA, 2015) e STZ (DELFINO et al., 2002; AKBARZADEH, 2007) em ratos.

Os resultados de glicemia semanal dos animais diabéticos permitem visualizar aumentos significativos da glicemia de jejum a partir da primeira semana de instalação da doença quando comparados aos valores glicêmicos basais, realizados antes da indução química do diabetes com aloxana ou STZ. Os animais do grupo TALX apresentaram glicemia média de $434,4 \pm 133,6$ mg/dL na primeira semana, chegando a $491,8 \pm 117,9$ mg/dL na quarta semana de acompanhamento, aumento significativo quando comparado ao grupo controle que foi de $92,2 \pm 7,4$ na primeira semana e $101,5 \pm 9,9$ na quarta semana. De maneira semelhante, os animais do grupo TSTZ apresentaram valores médios de glicemia de jejum de $402,2 \pm 32,7$

mg/dL na primeira semana e $459,8 \pm 199,1$ mg/dL na quarta semana, sendo significativamente elevados quando comparados ao grupo controle.

A medida da glicemia de jejum momentos antes da eutanásia dos animais permitiu a observação de hipoglicemia em um dos animais do grupo TSTZ. Esse animal apresentou valor glicêmico <10 mg/dL. Esse achado pode ser explicado pela suposição de que a toxicidade da aloxana poderia não ter afetado todas as populações de células β desse animal, ficando um remanescente de células que não sofreram necrose. Essas células sofreram, então, hipertrofia na busca de atender a demanda de insulina circulante havendo, posteriormente, uma grande secreção de insulina. Esse fato, associado à hipótese de que o animal diabético encontrava-se com suas reservas de glicogênio hepático esgotadas, acarretou em hipoglicemia.

A falta de ação insulínica resulta em diminuição da síntese de glicogênio (diminuição do glicogênio hepático e muscular) e também uma deficiência grave de absorção e utilização da glicose pelas células em virtude da diminuição no transporte através da membrana celular. Ao mesmo tempo, ocorre aumento na glicogenólise, perda de glicose pela urina e diminuição de captação da glicose pelo fígado. Todos esses fenômenos levam a uma hiperglicemia e, conseqüentemente, ao aparecimento dos sinais e sintomas característicos do diabetes *mellitus* (PEREIRA, 2008).

Alterações na pelagem, como pelo eriçado e sem brilho, estiveram presentes em todos os animais doentes. Além disso, observou-se aumento da circunferência abdominal, odor forte na urina e parasitose dos pelos, compatíveis aos achados em outros trabalhos (LERCO, et al., 2003; SILVA, et al., 2011).

Também foi observada uma alteração na genitália sugestiva de balanite. Essa alteração foi evidenciada em todos os animais do grupo TALX e em 78% dos animais do grupo TSTZ.

A balanite é definida como a inflamação da glândula (JANIER et al., 2016) resultada do supercrescimento de organismos que estão normalmente presentes nesse local (PORCHE, 2007) tendo o diabetes *mellitus* como um dos fatores de risco para sua ocorrência (SOH et al., 2016). A fisiopatologia envolve uma inflamação do tecido da glândula, que se torna edematosa (PORCHE, 2007). É sabido que a hiperglicemia interfere com os mecanismos normais de defesa do indivíduo (JHONSSON et al., 2013) estando associada com o aumento da susceptibilidade à

infecções (GOMES et al., 2014), provavelmente, por efeitos pró-inflamatórios e diminuição da fagocitose (LOPES, 2007).

Na análise histopatológica de pâncreas foi observado que animais diabéticos tratados com aloxana e STZ apresentaram ilhotas com diâmetro variável, formato irregular e algumas ilhotas com menor número de células. As Ilhotas pancreáticas dos animais do grupo controle apresentaram características histológicas normais, com formato oval e espalhadas através dos ácinos pancreáticos

Rins de animais do grupo controle apresentaram uma estrutura histológica típica, com morfologia glomerular normal. No entanto, a análise histológica renal de animais do grupo TSTZ mostrou glomérulos renais exibindo espaço de Bowman aumentado, formato de glomérulo alongado e irregular e cicatriz fibrótica, indicativa de possível processo regenerativo. A histopatologia de rins de animais do grupo ALX evidenciou morfologia glomerular preservada, entretanto foi visualizado a presença de necrose celular. O fato de não encontrarmos alterações glomerulares nas lâminas dos rins dos animais induzidos com aloxana não indica, necessariamente, a ausência de alterações histopatológicas nos rins dos animais induzidos com aloxana. A realização de cortes histológicos em determinadas regiões anatômicas dos rins, mas não em outras, mais centrais pode ter levado a não visualização de possíveis alterações nesse órgão.

Histologia normal típica foi observada em fígados de animais do grupo controle. No entanto, ao analisar a histopatologia hepática de animais do grupo TSTZ evidenciou-se a presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares próximo ao espaço portal e veias centrolobulares. Já em fígados de animais do grupo TALX, foi observado processo inflamatório próximo à tríade portal.

Achados semelhantes foram encontrados em trabalho de Vinagre e colaboradores (2010) no qual os autores observaram que pâncreas de animais induzidos com STZ apresentaram ilhotas de diâmetro reduzido e forma irregular, com um pequeno número de células. Esses autores evidenciaram ainda processo inflamatório infiltrativo na região periportal de fígados de animais diabéticos e cicatrizes fibróticas na análise histológica de rins. Ao induzir DM com aloxana em ratos, Nagy e Mohamed (2014) observaram uma clara diminuição na área ocupada pelas células β nas secções pancreáticas dos animais diabéticos e ativação de células de Kupffer em histopatologia de fígados dos animais diabéticos.

Pode-se sugerir que essas alterações histopatológicas se deram graças à ação da aloxana e STZ sobre esses órgãos. A expressão de receptores GLUT-2 nas células tubulares renais e nos hepatócitos permitem que a aloxana e STZ, transportadas para o interior das células através desses receptores, exerçam ação tóxica nos rins e fígado (LENZEN, 2008) levando a danos nesses órgãos.

As alterações histopatológicas observadas podem também ser atribuídas aos efeitos da hiperglicemia durante as quatro semanas de duração do experimento.

Em pesquisa realizada no *site* da Sigma-Aldrich® na primeira semana de março de 2017, obtivemos os valores de custo de aquisição da aloxana e STZ. A tabela 5 mostra os gastos relativos à indução do DM1 usando essas duas substâncias diabetogênicas com a metodologia empregada nesse trabalho.

Tabela 5 – Custos, em reais, para indução de DM1 usando aloxana (120 mg/kg) e STZ (60 mg/kg)

Substância	Custo da droga^a	Preço do animal^c	Custo animal total (n=10)	Custo para indução de diabetes em 10 animais^b	Gastos totais^d
Aloxana	298,00 (10 g)	17,00	170,00	4,16	174,16
STZ	473,00 (0,1 g x2)	17,00	170,00	421,25	591,25

^a custo da quantidade mínima ofertada no site da Sigma (aloxana) ou necessária para realizar o experimento (STZ)®

^b custo de administração da substância por animal, considerando o peso de 250 g

^c animal com idade de 90 dias, mantido por 30 dias, com peso entre 210 e 250g, em condições normais de biotério

^d considerando o preço do animal x 10 + custo para indução (n=10)

De posse desses valores, cabe ao pesquisador analisar a relação custo-benefício do uso de cada uma das substâncias. Se houver dificuldades na obtenção de animais para experimentos e facilidade na obtenção de recursos financeiros, provavelmente será vantajoso utilizar STZ, uma vez que a taxa de sucesso de indução é alta quando comparada à aloxana. Entretanto, se o pesquisador possui

acesso a animais e dispõe de poucos recursos, a aloxana pode ser uma opção a se considerar na ponderação do uso de cada uma das substâncias.

Em suma, esse trabalho apresenta a elaboração de um protocolo de indução do diabetes *mellitus* tipo 1 em ratos *Wistar* usando aloxana e STZ, dados clínicos do acompanhamento da doença cujos resultados espelham a deficiência de insulina decorrente do efeito da ação tóxica dessas drogas sobre as células β pancreáticas desses animais e uma análise histopatológica de rins, fígado e pâncreas, contribuindo para o conhecimento científico da indução experimental do diabetes *mellitus*.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com a aloxana e a STZ, foi possível concluir que:

- A técnica de indução química usando a STZ foi a mais satisfatória, quando considerada a relação desenvolvimento da doença/mortalidade. Entretanto, considerando o custo desse agente diabetogênico, em comparação com todos os outros fatores (preço do animal, ração, etc), existe uma desproporção que torna a aloxana mais conveniente;
- Foi possível obter um protocolo reprodutível da técnica de indução química pela STZ em ratos;
- Não há diferença entre o tempo de sobrevivência dos animais induzidos com aloxana e com STZ;
- Com relação aos parâmetros ingestão de água, excreção de urina e perda de peso, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com aloxana e STZ. Houve aumento significativo do consumo de ração dos animais do grupo TSTZ comparado ao grupo TALX;
- Animais do grupo TSTZ apresentaram alterações na histopatologia do pâncreas, rins e fígado enquanto que animais do grupo TALX apresentaram alterações histopatológicas em pâncreas e fígado e aparentemente não apresentaram alterações glomerulares nos rins.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.R. Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.26, p.31-60, 1998.
- AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007.
- AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.
- AL-HARIRI, M. T. Comparison the rate of Diabetes mellitus induction using Streptozotocin dissolved in different solvents in male rats. **Journal of Comparative Clinical Pathology Research**, p. 96-99, 2012.
- AL MAMUN, A. et al. Comparison of the Hypoglycemic, Hypolipidemic and Hepatoprotective Effects of *Asparagus racemosus* Linn. in Combination with Gliclazide and Pioglitazone on Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 8, n. 02, p. 52, 2017.
- ALBERTI, K. G. MM; ZIMMET, P. Epidemiology: Global burden of disease—where does diabetes mellitus fit in?. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 5, p. 258-260, 2013.
- ALMEIDA, M.O. Aspectos farmacológicas da insulinoterapia no diabetes mellitus tipo 1. **NOV@: Revista Científica**, v. 2, n. 2, p. 1-17, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, n. Supplement 1, p. S67-S74, 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, p. 81-90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 40, n. Supplement 1, p. S11-S24, 2017.
- ANTONY, P. J. et al. Myoinositol ameliorates high-fat diet and streptozotocin-induced diabetes in rats through promoting insulin receptor signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1098-1113, 2017.
- ARANTES, L. M. **Treinamento aeróbio e diabetes experimental em ratos: perfil endócrino-metabólico no cerebello**. 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- ASRI-REZAEI, S. et al. Effects of crocin and zinc chloride on blood levels of zinc and metabolic and oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 5, p. 403, 2015.

BALUCHNEJADMOJARAD, T. et al. S-allyl cysteine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-diabetic rats via suppression of oxidative stress, inflammation, and acetylcholinesterase. **European Journal of Pharmacology**, v. 794, p. 69-76, 2017.

BERTOLINI, N.O. **Efeitos do treinamento aeróbio sobre aspectos endócrino-metabólicos cerebrais em ratos diabéticos aloxânicos**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

BHAKKIYALAKSHMI, E. et al. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 9-16, 2016.

BHATT, L. K.; VEERANJANEYULU, A. . Enhancement of matrix metalloproteinase 2 and 9 inhibitory action of minocycline by aspirin: an approach to attenuate outcome of acute myocardial infarction in diabetes. **Archives of Medical Research**, v. 45, n. 3, p. 203-209, 2014.

BIGHETTI, B.B. **Avaliação do reparo de defeito ósseo em calvária de ratos diabéticos tratados com matriz óssea desminealizada**. 2011. 182 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas) - Faculdade de odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo.

BRASIL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília-DF, 2013.

BORDIN, D. L. et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 91-99, 2013.

BORGOHAIN, M. P. et al. Renoprotective and antioxidative effects of methanolic *Paederia foetida* leaf extract on experimental diabetic nephropathy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 451-459, 2017.

BORTOLUZ, S. et al. Condições de saúde e utilização de um serviço de atenção primária em pacientes hipertensos e/ou diabéticos. **Ciência & Saúde**, v. 9, n. 3, p. 156-166, 2016.

BRAGA, T. M. O. **Uma revisão de literatura acerca da adesão dos portadores de diabetes mellitus tipo I no programa de saúde da família (PSF)**. 2014. 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Enfermagem) - Faculdade de Ciências e Educação Sena Aires, Valparaíso de Goiás, Goiás.

BRAZ, N. I. **A insulina e o cérebro: da função à disfunção**. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

BRUNTON, L. L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Editora McGraw Hill, 12ª ed., 2012.

CANIVELL, S; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4, p. 403-407, 2014.

CHAUHAN, P. et al. Bougainvillea spectabilis exhibits antihyperglycemic and antioxidant activities in experimental diabetes. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, n. 3, p. 177-185, 2016.

CHARLTON, M.; NAIR, K. S. Protein metabolism in insulindependent diabetes mellitus. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.128, p.323S-27S, 1998.

CHERBAL, A. et al. Antidiabetic and hypolipidemic activities of Algerian *Pistachia lentiscus* L. leaves extract in alloxan-induced diabetic rats. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 157-162, 2017.

CHOUDHARI, S. K., et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v 11, 2013.

CUNHA, A. P. et al. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds—Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 68-76, 2017.

DAS, J. et al. Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 296-308, 2012.

DEEDS, M. C. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory animals**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011.

DELFINO, V.D. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DHANANJAYAN, I. et al. Ameliorating effect of betanin, a natural chromoalkaloid by modulating hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities and glycogen content in streptozotocin–nicotinamide induced experimental rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1069-1079, 2017.

DIAS, T. A. et al. Protocolo para indução experimental de diabetes mellitus por aloxana em ratas – resultados preliminares. **VIII Seminário de pós-graduação da UFG - Mestrado**. Disponível em: <www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/mestrado/trabalhos-mestrado/mestrado-tais-andrade.pdf>. Acesso em 22 de março de 2017.

EL-BASSOSSY, H. M. et al. Geraniol alleviates diabetic cardiac complications: Effect on cardiac ischemia and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1025-1030, 2017.

ELEAZU, C.O et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 60, 2013.

ETUK, E. U. Animal models for studying diabetes mellitus. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, n. 2, p. 130-134, 2010.

FARSANI, M. K. et al. Effects of aqueous extract of alfalfa on hyperglycemia and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic Wistar rats. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 8, n. 3, p. 103-108, 2016.

FERNANDES, N. S. M. **Alterações metabólicas no diabético**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto.

FRIEDERICH M. et al. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. **Current Diabetes Reviews** 2009, 5:120–144.

FU, Z. et al. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

FUZINATO, S. F. et al. Alterações nutricionais e metabólicas em diabéticos: desafios ao hiperdia de uma estratégia de saúde da família. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 29, n. 2, 2016.

GARGOURI, M. et al. Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by Spirulina supplementation. **Nutrition Research**, v. 36, n. 11, p. 1255-1268, 2016.

GENUTH S. Type 1 diabetes mellitus. **ACP Medicine**, 119, 2008.

GOMES, C. et al. Gliomas idh-mutados: revisão sobre diagnóstico, progóstico e tratamento. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 3, n. 3, p. 68-76, 2016.

GORRINI, C. et al. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews**, v 12, p 931-948, 2013.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, p. 137-149, 2014.

GUNDALA, N. K.V et al. Arachidonic acid (AA) and lipoxin A4 (LXA4) attenuate streptozotocin-induced cytotoxicity to RIN5F cells in vitro and type 1 and type 2 diabetes mellitus in vivo. **Nutrition**, 2016.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3.ed. São Paulo: Roca, 1993. p.48-55.

HOSSEINI, Azar et al. Effects of a standardized extract of *Rheum turkestanicum* Janischew root on diabetic changes in the kidney, liver and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 605-611, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 7th edition, 2016. Disponível em: <www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf> Acesso em fevereiro de 2017.

ISLAM, M. et al. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 7, n. 1, p. 06-11, 2017.

JAIN, S; SHARMA, B. Effect of ruthenium red, a ryanodine receptor antagonist in experimental diabetes induced vascular endothelial dysfunction and associated dementia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 164, p. 140-150, 2016.

JOHNSSON, K. M. et al. Vulvovaginitis and balanitis in patients with diabetes treated with dapagliflozin. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 5, p. 479-484, 2013.

KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, p. gfu405, 2014.

KIASALARI, Z. et al. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 654-661, 2017.

KIM, H.J. et al. Proteomic analysis of glomeruli from streptozotocin-induced diabetic rats. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 4, p. 650-659, 2014.

KR, S. G. et al. Mechanism of DNA binding and cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

KOLSI, Rihab Ben Abdallah et al. Effects of *Cymodocea nodosa* extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 257-267, 2017.

LEME, J. A. C. de A. al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. **Bioscience Journal (Online)**, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LOPES, A. C. **Diagnóstico e tratamento**. Volume 3. São Paulo: Manole, 2007.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. de. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 12, n. 2, p. 202-209, 1998.

LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiological Reviews**, v. 28, n. 3, p. 304-330, 1948.

MAHMOUD, M. F. et al. Studies on the antidiabetic activities of *Momordica charantia* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 758-765, 2017.

MELISSAS, J. et al. Is a Simple Food-Diverting Operation the Solution for Type 2 Diabetes Treatment? Experimental Study in a Non-Obese Rat Model. **Obesity Surgery**, v. 26, n. 5, p. 1010-1015, 2016.

MOHAMMED, S. I. et al. In vivo antidiabetic and antioxidant activities of *Coccinia grandis* leaf extract against streptozotocin induced diabetes in experimental rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 4, p. 298-304, 2016.

MORALES, I. M. et al. Cambios histopatológicos en el hígado de ratas Wistar con diabetes mellitus experimental. **Medicentro Electrónica**, v. 21, n. 2, p. 154-156, 2017.

MOREIRA, C; A. et al. Novos conceitos em diabetes e metabolismo ósseo. **CEP**, v. 80440, p. 020, 2015.

NAGY, M. A.; MOHAMED, S. A. Biochemical Effects of *Hydroclathrus clathratus* on Alloxan Induced Diabetic Rats. **American Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 76-83, 2014.

NAHID, S. et al. Cardio-and hepato-protective potential of methanolic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels seeds: A diabetic rat model study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 126-133, 2017.

NEWSHOLME, P. et al. Nutrient regulation of insulin secretion and action. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, p. R105-R120, 2014.

NG, C. S. et al. Cost-of-illness studies of diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 151-163, 2014.

NOVOSELOVA, E. G. et al. Signaling, stress response and apoptosis in pre-diabetes and diabetes: restoring immune balance in mice with alloxan-induced type 1 diabetes mellitus. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 24-31, 2016.

OLIVEIRA, M. C. M. **Caracterização do extrato aquoso de alpiste (*Phalaris canariensis* L.) e avaliação dos efeitos antioxidantes e hipoglicemiantes**. 2015. 284 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

OLIVEIRA, G. I. V. **Monitoramento da indução do diabetes mellitus em ratos Wistar com aloxana em diferentes doses**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo.

OU, Y. et al. Phycocyanin ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus in mice: Involved in insulin signaling pathway and GK expression. **Chemico-biological Interactions**, v. 247, p. 49-54, 2016.

PATRÍCIO, R. et al. **Diabetes mellitus na comunidade do Instituto Politécnico de Bragança: caracterização e conhecimentos**. In: II Congresso Internacional da Saúde Gaia Porto: Livro de Atas. Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, 2015. p. 56-60.

PEREIRA, J. V. . **Bioquímica Clínica**. João Pessoa: Editora Universitária, 2008. 364 p .

PEREIRA, R. F. **Avaliação da fosforilação da akt e do conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT-4 em músculo esquelético de ratos adultos com lesão periapical**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo.

PORCHE, D. J. Balanitis. **The Journal for Nurse Practitioners**, v. 3, n. 5, p. 310-311, 2007.

PUYO, S et al. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 1, p. 43-61, 2014.

RADENKOVIĆ, M et al. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13-31, 2016.

RAHIMI-MADISEH, M. et al. Effect of hydroalcoholic *Allium ampeloprasum* extract on oxidative stress, diabetes mellitus and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 363-367, 2017.

RAMADAN, B. K. et al. Hypoglycemic and pancreatic protective effects of *Portulaca oleracea* extract in alloxan induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 37, 2017.

REDIVO, D. D. B. et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 57-64, 2016.

RODEN, M. Diabetes mellitus–Definition, Klassifikation und Diagnose. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 128, n. 2, p. 37-40, 2016.

RUTTER, G. A. et al. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 203-218, 2015.

SALEH, F. A. et al. Hypoglycemic effects of *Prunus cerasus* L. pulp and seed extracts on Alloxan-Induced Diabetic Mice with histopathological evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 870-877, 2017.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Crocin attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. **Cytokine**, v. 88, p. 20-28, 2016.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852-871, 2012.

SARGIS, R. M. The hijacking of cellular signaling and the diabetes epidemic: mechanisms of environmental disruption of insulin action and glucose homeostasis. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 38, n. 1, p. 13-24, 2014.

SILVA, V.D et al. Comparison of induction of Diabetes mellitus with alloxan in different doses in Wistar rats. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4Supl, p. 2463-2470, 2014.

SILVA, V.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 1, 2015.

SINGH, S. N. et al. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 269-277, 2001.

SRINIVAS, N. R. Strategies for preclinical pharmacokinetic investigation in streptozotocin-induced diabetes mellitus (DMIS) and alloxan-induced diabetes mellitus (DMIA) rat models: case studies and perspectives. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 2015.

SPERLING, M.A. (Ed.). **Pediatric Endocrinology**. 4th edition. Netherlands: Elsevier, 2014.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. farmacêutica, 2016.

SOH, P. N. et al. Urinary and genital infections in patients with diabetes: How to diagnose and how to treat. **Diabetes & Metabolism**, v. 42, n. 1, p. 16-24, 2016.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overreview. **Ageing Research Reviews**, v 12, p 376-390, 2013.

THULESEN, J. et al. Short Term Insulin Treatment Prevents the Diabetogenic Action of Streptozotocin in Rats 1. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-68, 1997.

TRIPATHI, V; VERMA, J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 29-32, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VINAGRE, A. P. S. et al. Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 169-177, 2010.

WANG, Y. et al. The impact of a novel peach gum-derived polysaccharide on postprandial blood glucose control in streptozotocin-induced diabetic mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 379-386, 2017.

WU, J.; YAN, L.. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 181, 2015.

YANOFF, M; SASSANI, J.W. **Ocular Pathology**. 7th edition. Netherlands: Elsevier: 2015.

ZHANG, S. et al. Effects of troxerutin on cognitive deficits and glutamate cysteine ligase subunits in the hippocampus of streptozotocin-induced Type 1 diabetes mellitus rats. **Brain Research**, 2016.

ANEXO – CERTIDÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO DE PESQUISA

I. DADOS DO PROJETO		
1. Título do projeto: Estudo Comparativo da Indução de Diabetes Mellitus Tipo I Utilizando Aloxana e Estreptozotocina em Ratos Wistar		
2. Pesquisador responsável: Temilce Simões de Assis Cantalice		
3. Centro (Sigla): CCS	4. Departamento: DFP	
5. Número de protocolo: 166/2015	6. Data de submissão: 08/10/2015	7. Data da relatoria: 03/03/2016
8. Apresentação do projeto: Avaliar qual é o melhor método em termos de custo (preço da droga indutora, degradação da substância ao entrar em contato com o ar e diluentes, sensibilidade à temperatura e facilidade de indução de diabetes)-benefício (número de animais que se tornam diabéticos após a indução, sobrevivência pós-indução e tempo para o aparecimento das complicações associadas à doença) para a pesquisa e decorrência da degradação metabólica sofrida pelos animais em decorrência do diabetes.		
9. Substituição de metodologia: <input type="checkbox"/> SIM <input checked="" type="checkbox"/> NÃO		
9.1 Comentários: (Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia para redução do número de animais)		
II. INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS		
1. Espécie: Ratus norvegicus	2. Número amostral: 26	
3. Justificativa do número amostral:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Inadequado	
3.1 Comentários: A indução do modelo experimental de diabetes induz mortes, mencionado pelo proponente no projeto e no formulário como fato muito comum o que justifica um acréscimo de 4 animais (50%) para cada um dos dois grupos experimentais ficando cada grupo com 10 animais.		
4. Acomodação e manutenção:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado <input type="checkbox"/> Inadequado	
4.1 Comentários:		

5. Manipulação dos animais:

☒

Adequado

☐

Inadequado

4.1 Comentários:

6. Analgesia dos animais (se aplicável):

☐

Adequado

☐

Inadequado

6.1 Comentários:

Não se aplica.

7. Anestesia dos animais (se aplicável):

☐

Adequado

☐

Inadequado

7.1 Comentários:

Não se aplica.

8. Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒

Adequado

☐

Inadequado

8.1 Comentários:

Os animais serão eutanasiados por anestesia com cetamina 75 mg/kg e xilazina 10 mg/kg (i.p.) seguido por exsanguinação por secção das artérias carótidas e veias jugulares.

III. SITUAÇÃO DO PROJETO

☒

Aprovado

☐

Com pendência

☐

Negado

1. Considerações sobre o parecer:

Com base nestes argumentos, o parecer é favorável à aprovação e execução do projeto, salvo melhor juízo deste conselho.

João Pessoa, 03 de março de 2016.
Comissão de Ética no Uso de Animais.